PCT ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 : A61K 39/385, 47/48, C07K 17/08 — A1

(11) Numéro de publication internationale: WO 94/06472

(43) Date de publication internationale: 31 mars 1994 (31.03.94)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00876

(22) Date de dépôt international: 13 septembre 1993 (13.09.93)

(30) Données relatives à la priorité:
92/10879 11 septembre 1992 (11.09.92) FR

(71) Déposant *(pour tous les Etats désignés sauf US)*: INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR).

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants *(US seulement)* : GENGOUX, Christine [FR/FR]; 13, rue Docteur-Rouques, Cité Joliot-Curie, F-95100 Argenteuil (FR). LECLERC, Claude [FR/FR]; 127, rue de Javel, F-75015 Paris (FR).

(74) Mandataire: PHELIP, Bruno; Cabinet Harle & Phelip, 21, rue de la Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée
Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: ANTIGEN-CARRYING MICROPARTICLES AND THEIR USE IN THE INDUCTION OF HUMORAL OR CELLULAR RESPONSES

(57) Abstract

The invention concerns the use, in the induction of an immune response, of a synthetic microparticle polymer carrying on the surface one or more covalently bonded proteins capable of carrying one or more epitopes, the densities of the protein(s) on the surface of the microparticles, and their molecular weights, being adjusted so as to direct the immune response to the induction of a humoral and cellular response or to the induction of a largely cellular response. Said microparticles have an average diameter of approximately 0.25 to 1.5 µm.

(57) Abrégé

Utilisation pour l'induction d'une réponse immunitaire de microparticules en matériau synthétique polymère portant en surface une ou plusieurs protéines liées de manière covalente pouvant porter un ou plusieurs épitopes, les densités de la ou des protéines à la surface des microparticules, ainsi que leurs poids moléculaires, étant ajustées afin d'orienter la réponse immunitaire vers l'induction d'une réponse humorale et cellulaire ou vers l'induction d'une réponse majoritairement cellulaire. Les microparticules ont un diamètre moyen compris entre environ 0,25 et environ 1,5 µm.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	**FR**	France	**MR**	Mauritanie
AU	Australie	**GA**	Gabon	**MW**	Malawi
BB	Barbade	**GB**	Royaume-Uni	**NE**	Niger
BE	Belgique	**GN**	Guinée	**NL**	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	**GR**	Grèce	**NO**	Norvège
BG	Bulgarie	**HU**	Hongrie	**NZ**	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	**IE**	Irlande	**PL**	Pologne
BR	Brésil	**IT**	Italie	**PT**	Portugal
BY	Bélarus	**JP**	Japon	**RO**	Roumanie
CA	Canada	**KP**	République populaire démocratique de Corée	**RU**	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine			**SD**	Soudan
CG	Congo	**KR**	République de Corée	**SE**	Suède
CH	Suisse	**KZ**	Kazakhstan	**SI**	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	**LI**	Liechtenstein	**SK**	République slovaque
CM	Cameroun	**LK**	Sri Lanka	**SN**	Sénégal
CN	Chine	**LU**	Luxembour	**TD**	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	**LV**	Lettonie	**TG**	Togo
CZ	République tchèque	**MC**	Monaco	**UA**	Ukraine
DE	Allemagne	**MG**	Madagascar	**US**	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	**ML**	Mali	**UZ**	Ouzbékistan
ES	Espagne	**MN**	Mongolie	**VN**	Viet Nam
FI	Finlande				

"Microparticules portant des antigènes et leur utilisation pour l'induction de réponses humorales ou cellulaires"

La présente invention a pour objet des microparticules portant en surface des antigènes et leur utilisation pour l'induction de réponses humorales ou cellulaires.

Plus spécifiquement, l'invention concerne également des microparticules comportant, en surface, une densité importante d'antigènes.

Les cellules B qui expriment des récepteurs immunoglobulines spécifiques pour un antigène particulier sont hautement efficaces pour la présentation de cet antigène. (Rock et al. C., J. Exp. Med. (1984) 160; 1102; Hutchings et al. Eur. J. Immunol. (1987) 17:393). Par exemple, des cellules B spécifiques peuvent présenter la toxoïde tétanique à des cellules T à des concentrations en antigène 10^4 fois inférieures à celles requises pour la présentation par des cellules B non spécifiques ou des monocytes du sang périphérique. (Lanzavecchia, Nature, (1985) 314:537).

De plus, des études in vivo avec des souris déficientes en cellules B indiquent que ces cellules sont requises pour l'activation des cellules T des ganglions lymphatiques (Janeway et al. J. Immunol. (1987) 138:1051; Ron, et al. J., J. Immunol. (1987) 138:2848; Kurt-Jones et al. A.K. J. Immunol. (1987) 140:3773).

Les souris déficientes en cellules B présentent aussi des réponses réduites en ce qui concerne les cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$ spécifiques de tumeurs, après immunisation par le virus de la leucémie murine de Freund (Schultz et al., Science, (1990) 291).

La capacité des cellules B à modifier et à

présenter l'antigène en vue de la reconnaissance par des cellules T Helper $CD4^+$ restreintes au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHC) forme la base d'un modèle d'activation des cellules B par les cellules T. (Noëlle et al. The Faseb Journal. (1991) 5:2770).

La reconnaissance par des cellules T Helper $CD4^+$ du complexe peptide-MHC de classe II à la surface des cellules B permet la formation de conjugués stables physiquement entre les cellules T et les cellules B (Kupfer et al. S. J.. Proc. National Acad. Sci. USA. (1986) 83:6080).

Cette reconnaissance directe a pour résultat la prolifération et la différenciation de cellules B en réponse à des lymphokines telles l'Interleukine-2, l'Interleukine-4 ou l'Interleukine-5.

L'induction de la réponse anticorps contre un antigène nécessite donc la présentation de l'antigène par des cellules B.

La plupart des études sur la présentation de l'antigène ont été effectuées en utilisant des protéines solubles telles que la toxoïde du tétanos, le lysozyme, l'hémocyanine (LH). Cependant, la plupart des antigènes auxquels le système immunitaire est exposé, sont inclus dans des structures particulaires complexes telles que des bactéries ou des parasites.

Il est bien établi que les cellules qui sont capables de phagocytose telles que les macrophages peuvent présenter des antigènes bactériens à des cellules T.

Par contre, on ne sait pas si des cellules qui ne phagocytent pas, telles que les cellules B, peuvent présenter des antigènes complexes et de tailles importantes.

Il a été montré récemment que, in vivo, des

antigènes bactériens devaient être mis sous une forme soluble, pour induire une réponse anticorps dépendante des cellules T (Leclerc et al. J. Immunol. (1990) 144:3174; Leclerc et al. J. Immunol. (1991) 147:3545).

Il convenait cependant d'établir encore qu'in vivo, les antigènes protéiques bactériens sont exclusivement présentés aux cellules T par des cellules phagocytaires et que les cellules B ne peuvent modifier des antigènes sous forme de particules.

A cet effet, on a comparé, selon la présente invention, la capacité de macrophages et de cellules B à présenter le même antigène, sous une forme soluble et particulaire.

On a notamment utilisé des antigènes protéiques, tels que le lysozyme et le TNP-KLH, couplés à des microparticules de poly(acroléine) ou de polystyrène ayant une taille comparable à celle d'une bactérie.

Selon l'invention, on a montré de manière surprenante que les cellules B qui présentent le TNP-KLH ou le lysozyme de manière très efficace, sont incapables de présenter ces antigènes couplés à des billes. Par contre, les macrophages présentent les deux formes d'antigènes aux cellules T.

L'étude de la présentation des antigènes et de l'induction de la réponse T cellulaire et/ou humorale a une importance scientifique et médicale particulière.

En effet, l'orientation vers une réponse purement cellulaire ou une réponse purement humorale peut permettre de vacciner contre certains pathogènes, de modifier certains dysfonctionnements biologiques et de guérir certaines pathologies.

Par exemple, une telle orientation permettrait

d'éliminer des infections persistantes ou d'opérer une régulation des réponses allergiques.

De plus, il existe deux sous-populations de cellules T, $CD4^+$, les Th1 et les Th2 qui ont des capacités différentes à produire diverses lymphokines (Mosmann, Cherwinski, Bond, Giedlin et Coffman, J. Immunol., 136, 2348-2357 (1986)). L'induction de Th1 ou de Th2 joue un rôle majeur dans la résistance aux infections bactériennes, parasitaires ou virales. Ainsi, dans le cas de la leishmaniose cutanée murine, les Th1 protègent de l'infection alors que les Th2 aggravent la maladie. In vitro, les lymphocytes B stimulent de façon optimale la prolifération des clones Th2 alors qu'une forte prolifération des clones Th1 est observée avec les cellules adhérentes (Gajewski, Pinnas, Wong et Fitch. J. Immunol., 146, 1750-1758 (1991)).

L'orientation de l'antigène vers la présentation par des cellules B ou des macrophages peut permettre d'induire des réponses Th1 ou Th2.

Différentes techniques ont été développées jusqu'à présent pour induire une meilleure réponse immunitaire.

La plus ancienne des méthodes consiste à activer le système immunitaire à l'aide d'adjuvants. Ainsi, l'adjuvant de Freund permet d'augmenter l'intensité des réponses humorale et cellulaire. Cependant, de tels adjuvants présentent des inconvénients majeurs dus à leur manque de spécificité, à leur toxicité et aux réactions immunologiques parasites qu'ils risquent d'induire, en raison de leur manque de pureté.

Les iscomes (abréviation de l'expression immuno-stimulating complexes) sont composés d'un complexe antigénique et d'un adjuvant, le QuilA qui

est extrait d'un arbre. Ces particules ont un diamètre d'environ 35 nm et sont composées de sous-unités d'environ 12nm. Elles permettent d'induire une réponse immunologique mais le plus souvent les antigènes sont encapsulés et sont donc ensuite relargués dans le milieu extérieur. En outre, la technique ne permet pas un contrôle précis du type de cellules présentant ces particules, et de ce fait ces particules induisent une double réponse humorale et cellulaire.

Enfin, du point de vue pratique, on notera des difficultés de préparation, un manque de stabilité et une toxicité importante de ces particules.

Les liposomes dont l'utilisation a aussi été testée pour l'induction d'une réponse immunitaire présentent les mêmes inconvénients que les iscomes.

Des microparticules biodégradables comme par exemple des polymères d'acide lactique et glutamique ont aussi été développées (Aguado et Lambert, Immuno. Biol., 184, 113-125, (1992)). Ces microparticules libèrent au cours de leur dégradation, l'antigène sous forme soluble. Cette libération permet une présentation de l'antigène par diverses cellules et l'induction d'une réponse humorale sans possibilité d'orientation vers une réponse spécifiquement cellulaire.

Des particules constituées exclusivement de protéines recombinantes ont aussi été synthétisées. Ainsi, la demande de brevet français FR 2.635.532 décrit des particules composées d'une protéine hybride entre l'antigène HBs et une séquence immunogène supposée induire des anticorps neutralisants dirigés contre des virus HIV.

Des particules contenant la toxine de la poliomyélite ont aussi été fabriquées.

Ces particules présentent des inconvénients

notables. Ainsi, il est très difficile d'insérer des séquences longues dans ces particules. De plus, elles induisent tant une réponse humorale que cellulaire et il n'est donc pas possible d'obtenir spécifiquement l'une des deux.

Des particules de polyacroléine ou de polystyrène auxquelles sont couplés des anticorps ont déjà été utilisées pour la mise au point de techniques de séparation (Rembaum et al., Immunol. (1982) 52:341-351).

Aucune utilisation pour la préparation de vaccins et l'immunisation in vivo n'est néanmoins mentionnée. Les billes utilisées ont des diamètres de 20 à 35 nm (polyacroléine) ou de 40 à 120 µm (polystyrène).

Des particules de polyacroléine d'un diamètre de 2 µm ont aussi été utilisées pour étudier in vitro la stimulation des réponses T (Ziegler et al. Eur. J. Immunol. (1987), 17: 1287-1296). L'activité de ces billes n'est pas testée in vivo.

Dans l'ensemble de ces travaux, le critère de la taille des particules n'a jamais été considéré comme critique. Cependant, des particules de petites tailles (nanoparticules) comme les particules HBs pourraient être présentées par les lymphocytes B. Au contraire, des particules de taille trop importantes (supérieures à 5-10 microns) ne peuvent pas être présentées par des cellules phagocytaires.

Les diverses solutions proposées dans l'état de la technique d'une part pour permettre une induction d'une réponse immunologique importante et d'autre part pour diriger cette réponse spécifiquement dans une des deux voies de réponse, humorale ou cellulaire, ne sont donc pas satisfaisantes.

L'invention propose de mettre au point des

produits permettant d'obtenir une bonne réponse immunologique tout en ayant une orientation cellulaire ou humorale.

Selon l'invention, on a trouvé de manière surprenante qu'une telle réponse pouvait être induite à l'aide de microparticules, de faibles tailles et présentant des densités antigéniques variées.

La présente invention a particulièrement pour objet des microparticules en matériau synthétique polymère portant en surface une ou plusieurs protéines liées de manière covalente au matériau constituant les microparticules, la ou lesdites protéines portant chacune un ou plusieurs épitopes et étant présentes à une densité comprise entre 10^4 et 5.10^5 molécules/μm^2 pour chacune des protéines.

L'invention concerne aussi les caractéristiques ci-après, considérées isolément ou selon toutes leurs combinaisons techniquement possibles:

Le couplage des protéines antigéniques ou microparticules doit être covalent pour éviter la libération sous forme soluble de l'antigène.

Les microparticules ont avantageusement un diamètre moyen compris environ entre 0,25 μm et 1,5 μm, et préférentiellement d'environ 1 μm afin de pouvoir être présentées aux lymphocytes T, $CD4^+$ par des cellules phagocytaires mais pas par des lymphocytes B.

Lesdites microparticules sont plus particulièrement caractérisées en ce que la liaison covalente est réalisée par réaction des fonctions NH_2 et/ou CO des protéines et du matériau constituant la microparticule.

Avantageusement une telle liaison se fera par l'intermédiaire d'un agent pontant, tel que par exemple le glutaraldéhyde ou le carbodiimide.

Néanmoins, tout autre agent bifonctionnel permettant une telle liaison peut être utilisé. De tels agents sont connus, voir par exemple Synthetic polypeptides as antigens, M. H. Von Regenmortel, J. P. Briand, S. Muller and S. Plane 1988 (Elsevier). Cette liaison peut également être faite sans agent pontant.

Le matériau constituant la microparticule peut être avantageusement un polymère biocompatible, tel qu'un polymère acrylique, par exemple la polyacroléine ou le polystyrène ou des poly(alpha-acides hydroxyques), des copolymères d'acides lactiques et glycoliques, ou des polymères d'acides lactiques.

On entend par polymère tout homopolymère ou hétéro- ou copolymère.

Il doit permettre un couplage covalent des protéines au matériau et ne doit pas entraîner de réaction de rejet ou de toxicité de la part de l'organisme auquel il pourrait être injecté. Avantageusement, il s'agit, pour l'application en thérapeutique humaine, d'un polymère biodégradable, par exemple un polymère pouvant être dégradé par les cellules possédant des enzymes lysozomiaux, telles que les macrophages.

De tels matériaux biodégradables peuvent être des polymères d'acide lactique et glutamique de l'amidon ou des polymères utilisés pour des usages biomédicaux, et en particulier ceux utilisés dans les sutures.

Une telle microparticule peut porter à sa surface outre des protéines antigéniques, des molécules susceptibles d'activer le système immunitaire, telles que des interleukines, en particulier l'interféron-gamma ou l'interleukine 4.

Ces microparticules peuvent porter une ou plusieurs protéines qui peuvent elles-mêmes comprendre

chacune un ou plusieurs épitopes. De telles protéines peuvent être des glycoprotéines, des peptides synthétiques contenant un épitope ou plusieurs épitopes, ou toute autre molécule non protéique ou contenant une partie protéique pouvant induire une réponse immunitaire.

Les microparticules objets de la présente invention peuvent en outre être encapsulées afin de protéger les antigènes fixés à leurs surfaces d'une dégradation et afin de les amener jusqu'à leur lieu d'action.

Elles peuvent ainsi comprendre un noyau constitué d'une matrice polysaccharidique, à laquelle sont liés les antigènes, d'une première couche lipidique liée de manière covalente au noyau et d'une seconde couche de molécules amphiphiles.

L'invention a pour autre objet des médicaments ou vaccins comprenant les microparticules décrites ci-dessus, ainsi que des compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles les comprennent, en association avec des diluants ou des adjuvants pharmaceutiquement compatibles.

La présente invention est de manière générale relative à l'utilisation de microparticules en matériau synthétique polymère portant en surface une ou plusieurs protéines liées de manière covalente, la ou lesdites protéines portant chacune un ou plusieurs épitopes T ou B, pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin pour l'induction d'une réponse immunitaire, selon laquelle les densités de la ou des protéines à la surface des microparticules sont ajustées afin d'orienter ladite réponse immunitaire vers une réponse majoritairement humorale ou majoritairement cellulaire.

Sous un autre aspect, l'invention a aussi pour

objet un procédé pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin dont la réponse immunitaire est soit majoritairement humorale soit majoritairement cellulaire, de type Th1 ou Th2, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'on fixe de manière covalente sur des microparticules ou billes en matériau synthétique polymère au moins une protéine portant un ou plusieurs épitopes en faisant varier la densité de la protéine fixée à la surface selon le type de réponse désirée.

Afin d'induire une réponse cellulaire et humorale, on utilisera préférentiellement des microparticules présentant une densité pour chacune des protéines portant un épitope d'au minimum 10^5 et préférentiellement d'environ 5.10^5 molécules/μm^2. De telles densités correspondent environ pour une bille d'un diamètre de 1μm à des quantités de protéines à la surface de la microparticule respectivement de 10^5 et 4.10^5 molécules.

En vue de l'induction d'une réponse majoritairement cellulaire, $CD4^+$, classe II restreinte, on utilisera, préférentiellement, des microparticules présentant une densité pour chacune des protéines portant un épitope comprise entre environ 10^4 et 5.10^4 molécules de protéines/μm^2.

Afin de favoriser l'induction de cette réponse cellulaire , on utilisera préférentiellement des microparticules portant en surface des protéines ayant des poids moléculaires supérieurs à 50 kD.

Les autres caractéristiques de ces microparticules sont celles mentionnées plus haut concernant les microparticules à haute densité.

Les protéines et antigènes liés de manière covalente aux microparticules dépendent de l'application prévue desdites microparticules.

Elles dépendent également du type de réponse

immunitaire que l'on souhaite induire, mais aussi de la maladie ou de l'affection que l'on souhaite traiter ou dont on souhaite prémunir le sujet.

A titre d'exemple, on pourra utiliser les épitopes de la région Pre S2 de l'antigène HBS du virus de l'hépatite virale dont les séquences sont les suivantes:

- épitope T: Pre S:T (120-132)

MQWNSTTFHQTLQ

- épitope B: Pre S:B (132-145)

QDPRVRGLYFPAGG

On peut aussi citer à titre d'exemples les épitopes de la protéine VP1 du virus de la poliomyélite dont les séquences sont les suivantes:

- épitope T: C3:T (103-115)

KLFAVWKITYKDT

- épitope B: C3:B (93-103)

DNPASTTNKDK

Un autre exemple de séquence est l'épitope de la boucle V3 de la protéine GP120 du virus HIV1 dont la séquence est la suivante:

- épitope T + B: boucle V3

INCTRPNNNTRKSIRIQRGPGRAFVTIGKIGNMRQAH CNI

On utilisera préférentiellement les épitopes B pour induire une réponse humorale à l'aide de microparticules à forte densité et les épitopes T pour induire une réponse majoritairement cellulaire à l'aide de microparticules à faible densité en

protéines de surface.

De telles microparticules seront injectées aux patients que l'on veut traiter de manière thérapeutique ou prophylactique par les moyens connus de l'homme du métier, par exemple par injection sous-cutanée, intrapéritonéale, intraveineuse, ou par tout autre moyen permettant d'induire une réponse immunitaire.

On se reportera à ce sujet à Current protocols in immunology, (Edited by J.F. Coligen, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober Wiley-Intersciences Editors) dans lequel sont répertoriées les techniques d'immunisation.

Un des avantages particuliers de la présente invention réside dans le fait qu'elle permet d'induire des réponses immunitaires humorale ou cellulaire sans adjonction d'adjuvants aux billes ou microparticules. Néanmoins, l'adjonction d'adjuvants non toxiques et n'entraînant pas de réaction immunitaire parasite est aussi envisageable dans le cadre d'une utilisation selon la présente invention.

La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples qui suivent dans lesquels:

Les diagrammes de la Figure 1 sont des résultats d'analyses par fluorométrie (FACS) de microparticules portant des antigènes KLH ou TNP-KLH. Les ordonnées indiquent l'anticorps utilisé (PBS-témoin, anti-KLH, anti-TNP). Les abscisses indiquent les types de microparticules testées: B (KLH), B (TNP-KLH), B (OVA) et B (OVA-TNP) qui correspondent à des microparticules sur lesquelles sont liés respectivement le KLH, le TNP-KLH, l'ovalbumine et l'ovalbumine-TNP.

Les figures 2A à 2D représentent la capacité de

cellules de rate, de macrophages et de cellules spécifiques B du TNP et activées par le LPS à présenter respectivement le KLH, le TNP-KLH, des microparticules portant du KLH et des microparticules portant le TNP-KLH.

La Figure 3 est une courbe indiquant les réponses prolifératives de cellules ganglionnaires de souris immunisées par le lysozyme soluble et stimulées in vitro par le lysozyme soluble (figure 3A) ou par des microparticules portant le lysozyme de diamètres 0,25, 0,75 et 1,5 µm (figure 3B). La prolifération cellulaire est mesurée par l'incorporation de thymidine (CPM) en ordonnées, tandis que la dilution des microparticules est indiquée en abscisses.

La Figure 4 représente la production d'IL2/IL4 par un hybridome spécifique du lysozyme après stimulation par du lysozyme soluble (figure 4A) ou par des microparticules portant du lysozyme (figure 4B). Les concentrations des microparticules sont indiquées en abscisses, tandis que la prolifération est indiquée en ordonnées.

Les Figures 5A et 5B représentent l'activation de l'hybridome T spécifique du lysozyme mesurée par la production d'IL2/IL4 après stimulation par le lysozyme soluble (figure 5A) ou couplé aux microparticules (figure 5B) en présence de splénocytes ou de cellules B(A20) comme cellules présentant l'antigène.

Les Figures 6A et 6B représentent la prolifération in vitro après stimulation par le lysozyme soluble de cellules de ganglions inguinaux de souris immunisées respectivement par du lysozyme soluble en adjuvant complet de Freund (Figure 6A) et par du lysozyme couplé à des microparticules (Figure 6B).

Les figures 7A et 7B représentent la

prolifération in vitro après stimulation par le lysozyme de cellules de ganglions inguinaux de souris immunisées par diverses concentrations de lysozyme soluble (7A) ou couplé à des microparticules (7B).

La figure 8 représente la prolifération de cellules ganglionnaires de souris immunisées par le lysozyme en adjuvant complet de Freund ou en PBS ou en présence de microparticules couplées à de l'hémocyanine de patelle, ou KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin).

La Figure 9 représente la réponse proliférative de cellules ganglionnaires de souris immunisées par de l'hémoglobine soluble en adjuvant (Hb + CFA) ou couplée à des billes (B-Hb).

La Figure 10 représente la réponse proliférative de cellules de souris stimulées par de l'ovalbumine soluble (OVA + CFA) ou de l'ovalbumine couplée à des billes (B-OVA).

La réponse proliférative, respectivement à l'hémoglobine et à l'ovalbumine , a été mesurée en ordonnées par la radioactivité incorporée (CPM), en fonction de la quantité d'hémoglobine ou d'ovalbumine (en abscisses) utilisée pour restimuler les cellules.

La Figure 11 illustre la prolifération de cellules de souris immunisées par le peptide C3 sous forme soluble (C3:T + CFA) ou sous forme microparticulaire (B-C3: T). Les cellules ont été restimulées en présence de quantité de C3 soluble (en abscisses) et la prolifération a été mesurée (en ordonnées).

La Figure 12 représente la prolifération des cellules de souris immunisées par le peptide pré-S:TB soluble (Pré-S:TB + alum) ou sous forme microparticulaire (B-pré-S:TB) ou le peptide pré-S:B sous forme particulaire (B-Pré S:B) et restimulées par le peptide Pré-S.

Les Figures 13A et 13B représentent respectivement les taux d'anticorps anti-lysozyme (Figure 13A) et d'anticorps anti-KLH (Figure 13B) de souris immunisées avec du lysozyme et de l'adjuvant alun, des microparticules portant du lysozyme ou des microparticules portant du LH.

Les Figures 14 et 15 illustrent la réponse anticorps de souris immunisées par l'hémoglobine (Figure 14) ou l'ovalbumine (Figure 15) sous forme soluble ou particulaire . Le Log du titre en anticorps est représenté en ordonnées tandis que le temps est représenté en abscisses.

La Figure 16 est relative à la réponse anticorps de souris immunisées par le peptide pré-S : TB soluble ou les peptides pré-S: TB ou pré-S: B sous forme particulaire. L'ordonnée et l'abscisse de cette courbe ont la même signification que pour les Figures 14 et 15.

La Figure 17A représente la prolifération de cellules de souris immunisées par injection de lysozyme en présence d'adjuvant de Freund, après stimulation in vitro par des microparticules portant du lysozyme à différentes densités.

La Figure 17B représente la prolifération in vitro de cellules de souris immunisées in vivo par du lysozyme ou des billes portant du lysozyme après stimulation par différentes concentrations de lysozyme.

La Figure 18 est un diagramme illustrant la production d'anticorps anti-lysozyme de cellules de souris immunisés par injection de lysozyme et d'adjuvant de Freund ou de microparticules portant du lysozyme.

EXEMPLE 1:

Préparation de billes couplées à KLH ou à

l'ovalbumine.

1. Matériel et méthodes et présentation par des cellules B ou par des macrophages.

Les souris sont des femelles BALB/c et DBA/2 âgées de 6 à 8 semaines.

Les antigènes sont le KLH et l'ovalbumine (OVA) commercialisés par Sigma Chemical (St-Louis, USA). L'hémocyanine trinitrophénylée (TNP4-KLH) a été préparée telle que décrit précédemment (Shutze et al., J. Immunol. (1989) 142:2635).

1.1 Couplage covalent des antigènes ou microparticules de poly(acroléine).

Des microparticules de poly(acroléine) d'un diamètre compris entre 0,25 et 1,5 µm, commercialisées par Polysciences Inc. (Washington PA), sont couplées à l'ovalbumine ou au KLH comme décrit précédemment (Rembaum et al. Immunol. (1982) 52:341; Ziegler et al. Eur. J. Immunol. (1987) 17:1287).

1 ml de ces microparticules est lavé deux fois dans du PBS et resuspendu dans 1 ml de KLH ou d'ovalbumine (5 mg/ml dans du PBS). Après trois heures d'incubation à température ambiante, les microparticules sont lavés deux fois dans du PBS et resuspendus dans 2 ml de PBS contenant 1% de sérum albumine bovine (BSA) et des antibiotiques. Les microparticules ainsi obtenues sont stockées à 4°C jusqu'à utilisation.

Les microparticules portant les antigènes TNP-OVA ou TNP-KLH sont préparées par incubation de microparticules portant l'OVA ou le KLH avec du TNBS (Trinitrobenzène sulfonate).

2 ml des microparticules qui ont été couplées au KLH ou à l'ovalbumine sont lavés deux fois dans du PBS et resuspendus dans 2 ml de tampon cacodylate contenant 10 mg/ml de TNBS. Les microparticules sont

incubées 30 minutes dans l'obscurité à la température ambiante et lavées trois fois dans du PBS. Elles sont resuspendues dans 2 ml de PBS contenant 1% de BSA et des antibiotiques et stockées à 4°C.

1.2 Analyse par cytofluorométrie de flux.

50 µl de microparticules sont lavés deux fois dans du PBS contenant 1% de BSA et incubés durant 40 minutes à 4°C avec du sérum de souris anti-KLH ou anti-TNP. Après deux lavages, les microparticules sont incubées avec des anticorps de chèvre couplés au FITC (fluoroisothiocyanate) dirigés contre des immunoglobulines de souris (Biosys, Compiègne, France) durant 40 minutes à 4°C.

Après quatre lavages, les microparticules sont resuspendues dans 1 ml de PBS contenant 1% de BSA.

L'intensité de fluorescence est mesurée en utilisant le cytomètre de flux FACSCAN (Becton Dickinson, Mountain View.CA).

1.3 Milieu de culture.

Les lymphocytes sont cultivés dans du RPMI 1640 (Seromed, Munich, FRG) complémentés avec de la L-glutamine 2mM, 10% de FCS (sérum de veau foetal) inactivé par la chaleur, du 2-ME 50µM et des antibiotiques.

1.4 Etablissement de la lignée cellulaire Th spécifique du KLH.

Cette lignée cellulaire est établie et maintenue selon le protocole décrit par Taylor et al. (ed. IRL Press. New York) et Galelli et al. (J. Immunol. (1990) 145:2397).

Des cellules de ganglions inguinaux (4 10^6/ml) de souris DBA/2 ayant subi 8 jours avant le prélèvement des cellules, une injection de 100 µg de KLH en émulsion dans de l'adjuvant complet de Freund à la base de la queue ont été cultivées durant 4 jours

dans du milieu de culture en présence de KLH (100 µg/ml).

Les cultures sont incubées dans une atmosphère humide à 7,5% de CO_2 à 37°C.

Une lignée cellulaire a été établie à partir de cette culture initiale par des passages en série de cellules T purifiées sur Ficoll (2.10^5/ml) en présence de cellules de rate de souris DBA/2 irradiées (3000 rad) durant 6 à 8 jours (période de repos) ou avec des cellules de rate irradiées plus du KLH (100 µg/ml) durant 4 jours (période de stimulation).

Les cellules T utilisées dans les expériences sont récoltées 8 à 10 jours après leur dernière mise en présence du KLH.

1.5 Estimation de la prolifération des cellules Th.

Des cultures en triplicats contenant 5.10^4 cellules Th purifiées sur Ficoll, et 5.10^4 cellules B mémoire spécifiques du TNP purifiées et irradiées (900 rad), ou 5.10^5 cellules de rate totales irradiées (3000 rad), ou $10.^5$ cellules de rate adhérentes irradiées (3000 rad), ou 10^5 cellules B de lymphome A20 positives pour le MHC de classe II irradiées (3300 rad) (Kim et al. J. Immunol. (1979) 122:549), ou 10^5 cellules B vierges spécifiques du TNP et activées par le LPS comme source de cellules présentant les antigènes, et différentes concentrations d'antigène ont été incubées dans des plaques de microculture à fond plat (Corning, Cambridge, MA) sous un volume total de 0,2 ml/puits de milieu complet. La prolifération cellulaire T a été estimée par incorporation de la thymidine tritiée durant les huit dernières heures d'une culture de 3 jours.

Les résultats sont exprimés comme la moyenne géométrique de trois cultures, une fois éliminé le bruit de fond. L'écart type est inférieur à 15 % de la

moyenne.

1.6 Cellules B spécifiques du TNP.

Les cellules B spécifiques du TNP de souris normales sont purifiées par liaison et élution sur une gélatine-TNP8 et selon la technique décrite par Haas et Layton J. E., J. Exp. Med. (1975) 141:1004.

Ce protocole a été modifié afin d'obtenir des populations enrichies en cellules B mémoires spécifiques du TNP à partir de la rate de souris précocement immunisées, comme précédemment décrit (Galelli et al. J. Immunol. (1990) 145:2397). Les cellules B mémoire spécifiques du TNP ont été sélectionnées sur de la gélatine portant un haptène (gélatine-TNP2), en testant l'affinité des récepteurs pour le TNP par comparaison aux cellules B vierges, et la capacité à secréter de larges quantités d'immunoglobulines G anti-TNP en présence de faibles concentrations d'antigènes.

10^8 cellules de rate ne contenant ni érythrocytes ni cellules mortes ont été suspendues dans 3 ml de HEPES (50 mM) tamponnées par du DMEM (Seromed, Munich, Allemagne) et incubées dans des boîtes de Pétri en plastique recouvertes de gélatine-TNP2. Les boîtes sont agitées de manière douce durant 15 minutes à 4°C, puis lavées 10 fois par du DMEM à la température de la glace. Les cellules adhérentes sont éluées en ajoutant 5 ml de DMEM réchauffé à 37°C et la gélatine-TNP liée est éliminée par digestion par la collagénase (Collagenase CLSIII de Worthington Biochemicals Freehold, New Jersey, 100 U/ml) durant 15 minutes à 37°C.

Ce protocole conduit à l'obtention finale, exprimée comme un pourcentage par rapport au nombre de cellules de rate d'origine, de 0,3 à 0,6 % de cellules liant le TNP à partir de rate de souris immunisées.

Les cellules sont cultivées toute la nuit avant l'addition d'autres cellules et réactifs afin de permettre la réexpression d'immunoglobulines de surface modifiées par le traitement par la collagénase. La présence de récepteurs libres du TNP sur ces cellules est évaluée par leur capacité à lier des érythrocytes portant à leur surface du TNP.

55 à 76 % des cellules obtenues à partir de souris immunisées forment des rosettes avec des SRBC modifiées par le TNP. Ces cellules ne prolifèrent pas en réponse à la concanavaline A mais sont enrichies 20 fois, pour les cellules qui secrètent les immunoglobulines G anti-TNP après stimulation par TNP-LH, par comparaison aux cellules de rate non fractionnées.

1.7 Cellules B vierges spécifiques du TNP et activées par le LPS

Des cellules B vierges spécifiques du TNP de souris et non immunisées ont été purifiées par liaison puis élution sur de la gélatine-TNP8 comme décrit précédemment. Ces cellules ont été cultivées à une densité de 2.10^6 par ml dans un milieu contenant 50 µg/ml de LPS (Salmonella enteriditis, Difco Laboratories, Détroit, MI) durant 3 jours. Les lymphoblastes non adhérents ont été purifiés en utilisant du Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Piscataway, NJ), puis lavés et utilisés comme cellules accessoires.

1.8 Macrophages.

Les macrophages ont été obtenus à partir de cellules de rate non immunisées par adhésion durant 4 heures à 37°C suivie d'un lavage des cellules afin d'éliminer les cellules non adhérentes tel que décrit précédemment (Kakiochi et al. J. Immunol. (1983) 131:109).

2. Résultats.

2.1 Vérification du couplage de l'antigène aux microparticules.

Le KLH a été couplé de manière covalente à des microparticules de polyacroléine d'un diamètre de 0,25 à 1,5 µm. Le couplage du KLH aux microparticules a été contrôlé par analyse en cytofluorométrie de flux en utilisant un sérum de souris anti-KLH.

Les résultats obtenus avec des microparticules de 1,5 µm sont indiqués sur la Figure 1.

Les microparticules de 1,5 µm ont été couplées à l'ovalbumine (B OVA) ou à la KLH (B-KLH). Les microparticules TNP-OVA ou TNP-KLH (respectivement désignées B(TNP-OVA) et B (TNP-KLH)) ont été préparées par incubation de microparticules portant l'OVA ou le KLH avec du TNBS. L'analyse par cytofluorométrie a été effectuée sur des microparticules incubées en présence de PBS ou en présence de sérum de souris anti-KLH ou anti-TNP. Après lavage, les microparticules ont été incubées avec des anticorps de chèvre liés au FITC dirigés à l'encontre des immunoglobulines de souris et ont été analysées par cytométrie de flux.

Des résultats similaires ont été obtenus avec des microparticules de 0,25 et 0,75 µm.

Les microparticules témoins couplées avec de l'ovalbumine n'ont pas été reconnues par le sérum anti-KLH.

2.2. Comparaison de la capacité de diverses populations de splénocytes à présenter des antigènes solubles ou particulaires.

La capacité de splénocytes non fractionnés, de macrophages et de cellules B vierges spécifiques pour le TNP a été comparée quant à leur présentation de KLH et de TNP-KLH soluble ou particulaire à des cellules T spécifiques du KLH.

Dans ces expériences, des populations de splénocytes ont été préparées à partir de souris non immunisées. Après purification, les cellules B spécifiques du TNP ont été activées durant trois jours par du LPS; on sait en effet que les lymphoblastes induits par le LPS sont des cellules très efficaces quant à la présentation d'un antigène (Kakiochi et al. J. immunol. (1983) 131:109).

Les résultats sont illustrés sur la Figure 2 pour laquelle 5.10^5 splénocytes irradiés, 10^5 cellules adhérentes ou 10^5 cellules B vierges spécifiques du TNP activées par le LPS ont été cultivées avec 5.10^4 cellules Th spécifiques du KLH en présence de quantités variées de KLH soluble (A), de TNP-KLH soluble (B) ou fixés sur des microparticules (B KLH) (C) ou de B (TNP-KLH) (D)). La prolifération cellulaire Th a été estimée au jour 3.

Comme le montre la Figure 2 (2A et 2B), les macrophages et les cellules B activées par le LPS stimulent de manière efficace les cellules T quand ils sont incubées avec du KLH ou du TNP-LH solubles.

Contrairement à ces résultats, seuls les macrophages, et non les cellules B spécifiques du TNP et activées par le LPS sont capables de stimuler les cellules T spécifiques du KLH (Figures 2 C et D) quand des microparticules portant du KLH ou du TNP-KLH sont utilisées.

Ces résultats montrent que les macrophages sont responsables de l'activité de présentation de l'antigène des cellules spléniques quand des antigènes particulaires sont utilisés.

Ainsi l'incapacité de cellules B spécifiques du TNP à présenter l'antigène particulaire a été illustrée.

EXEMPLE 2.

Induction d'une réponse prolifération T, $CD4^+$ spécifiques du lysozyme in vivo et in vitro par des microparticules couplées au lysozyme.

1. MATERIELS ET METHODES.

1.1 Antigènes

Le lysozyme (LYSO) et l'hémocyanine de Limulus (LH) proviennent des Laboratoires Sigma.

1.2 Couplage de l'antigène aux microparticules

L'antigène soluble est rendu particulaire par couplage à des microparticules (Polysciences) de 0.2 à 1µm de diamètre. Deux méthodes de couplage sont utilisées:

1.2 a) Couplage covalent directement sans agent activant.

Les billes ou microparticules de polyacroléine portent des groupements aldéhyde capables de réagir spontanément avec les fonctions amines des protéines.

1 ml de billes est lavé 4 fois dans du PBS, et repris dans 1 ml d'antigène à 5 mg/ml. Après 3 heures d'incubation à température ambiante, les billes sont lavées 3 fois dans du PBS et incubées 30 minutes dans 1 ml de PBS-Albumine humaine 1% afin de saturer les groupements réactifs libres des billes. Puis après lavage, les particules sont reprises dans 2 ml de PBS-albumine humaine 1%-antibiotique 1% puis conservées à +4°C.

b) Couplage covalent par le glutaraldéhyde.

L'antigène est couplé aux billes de polystyrène par le glutaraldéhyde, capable de former une base de Schiff avec les groupements amines des protéines.

0,5 ml de billes est lavé 3 fois dans du PBS et repris dans 0,5 ml de glutaraldéhyde 8%. Après 6 heures d'incubation à température ambiante, les billes

sont lavées 2 fois et reprises dans 1 ml d'antigène à 400µg/ml. Après incubation pendant la nuit à température ambiante, les billes sont lavées et incubées avec 1 ml d'éthanolamine 0,2 M pendant 30 minutes afin de bloquer les fonctions aldéhyde libres du glutaraldéhyde.

Après un dernier lavage, les particules sont reprises dans 1 ml de PBS- albumine humaine 1%- antibiotique 1% puis conservées à +4°C.

Cette méthode de couplage permet de déterminer la quantité de protéines couplées sur les microparticules par spectrophotométrie. Les absorbances de la solution de protéine à 400 µg/ml et du surnageant obtenu après l'incubation des billes avec cette solution de protéine sont mesurées à 280 nm. Connaissant le nombre de billes utilisées pour le couplage, on considère que la différence entre la quantité de protéine avant couplage et la quantité résiduelle après couplage, permet d'estimer la quantité de lysozyme couplée par particule.

1.3 Protocole d'immunisation.

On a utilisé des femelles BALB/c, d'haplotype H-2^d, âgées de 6 à 8 semaines (élevage de l'Institut Pasteur).

- immunisation par voie intra-péritonéale: on injecte 100 µg de lysozyme avec 1 mg d'alum, ou, différentes quantités d'antigène couplé aux billes sans adjuvant,

- immunisation par voie sous-cutanée: à la base de la queue, on injecte 100 µg de lysozyme en émulsion dans l'adjuvant complet de Freund, ou, différentes quantités d'antigène couplé aux billes.

Le sérum de chaque souris est prélevé 7 ou 14 jours après chaque injection. La teneur en anticorps des sérums est mesurée par test ELISA.

La réponse proliférative cellulaire est mesurée sur les ganglions inguinaux et/ou sur la rate, prélevés 7 et/ou 14 jours après chaque injection.

1.4 Détection des anticorps par ELISA.

L'antigène (lysozyme) est incubé à la concentration de 5µg/ml en tampon carbonate 50 mM-pH=9.6, dans des microplaques (Nunc) pendant une nuit à 4°C. Après lavage avec un tampon PBS-Tween 20 à 0,01%, les différentes dilutions des sérums à tester, réalisées en tampon BSA 1%, sont incubées pendant 1 heure à 37°C. Après lavage, on dépose 100 µl par puits d'un conjugué anti-Ig de souris (anti-Ig totales fournis par Diagnostics Pasteur et anti-Ig spécifiques par Sigma), marqué à la peroxydase, préparé chez la chèvre; qui est incubé pendant 1 heure à 37°C. Après lavage, on ajoute la solution de substrat préparée extemporanément: Orthophénylènediamine à 0,5 mg/ml (Sigma) en tampon acide citrique 0.1 M-phosphate disodique 0.2M-pH=5 auquel on ajoute H_2O_2 au 1/2500.

Une coloration jaune révèle la présence d'anticorps spécifiques; la réaction enzymatique est arrêtée 8 minutes plus tard, par 50 µl de H_2SO_4 (11,5%).

L'absorbance de chaque puits est mesurée à 492 nm, par un lecteur de densité optique (Dynatech). Le contrôle négatif est réalisé avec du sérum au 1:100 de souris BALB/c non immunisées. Les résultats sont exprimés: soit en DOx1000 à partir de l'absorbance mesurée, corrigée de l'absorbance en absence de sérum; soit par le titre en anticorps calculé à partir de régression linéaire basée sur l'absorbance obtenue avec le sérum de souris BALB/c non immunisées.

Lorsque l'antigène est sous forme particulaire, le test ELISA est réalisé en tubes. Les dilutions des sérums à tester sont incubées directement avec

l'antigène couplé aux billes (8.10^8 particules/ml). Les lavages se font par centrifugation dans le tampon PBS-Tween 20 (0.01%). Lorsque la réaction enzymatique est terminée, 200 µl de chaque tube sont transférés en microplaque puis l'absorbance est mesurée.

1.5 Inhibition de la fixation des anticorps anti-lysozyme par test ELISA.

Le test ELISA mesure la fixation des anticorps spécifiques présents dans le sérum de souris BALB/c immunisées par le lysozyme. Cette fixation est diminuée si le sérum est préincubé (avant le test ELISA) avec l'antigène: lysozyme soluble ou couplé aux billes, qui se comporte alors, comme un inhibiteur.

Le sérum anti-lysozyme est préincubé avec le lysozyme soluble ou couplé aux billes, pendant 1 heure à 37°C puis la nuit à 4°C; la réaction se faisant en tubes. La fixation des anticorps non-liés à l'inhibiteur est évaluée par test ELISA (triplicats) en microplaques, dont les puits ont été recouverts par du lysozyme à 5 µg/ml. L'absorbance de chaque puits est mesurée à 492 nm, et corrigée de l'absorbance en absence de sérum. Le contrôle négatif est réalisé avec du sérum au 1:100 de souris BALB/c non immunisées. L'absorbance sans inhibiteur lors de la préincubation de sérum, correspond à la fixation maximale d'anticorps anti-lysozyme.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de fixation des anticorps et calculé selon le rapport

$$\frac{\text{DO sans inhibiteur} - \text{DO avec inhibiteur}}{\text{DO sans inhibiteur}}$$

La détermination graphique de la concentration de lysozyme soluble ainsi que du nombre de billes couplées au lysozyme, nécessaire pour 50%

d'inhibition, permet d'estimer la quantité de lysozyme fixée par particule.

1.6 Stimulation d'un hybridome T spécifique du lysozyme

Un hybridome T a été produit par immunisation de souris BALB/c avec du lysozyme. Il reconnaît spécifiquement le peptide 108-116 du lysozyme, en association avec les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II I-E^d.

10^5 cellules d'hybridome T sont stimulées par des concentrations croissantes d'antigène: lysozyme ou billes couplées, en présence de différentes cellules présentatrices de l'antigène: 5.10^5 splénocytes irradiés (3000 rad) de souris BALB/c ou 10^5 cellules de lymphome B A20, restreintes par les molécules de CMH de classe II. Les cellules sont mises en culture (triplicats) dans un milieu complet RPMI 1640 (SEROMED) additionné de 10% de sérum de veau foetal décomplémenté, 50 μM de β-mercaptoéthanol, 2mM de glutamine, 100 UI/ml de pénicilline et 100μg/Ml de streptomycine, en microplaque à fond plat (Corning 25860). Le témoin positif est réalisé par stimulation de l'hybridome par le mitogène de lymphocytes T: concanavaline A à 5 μg/ml.

Le surnageant est prélevé après 24h de culture à 37°C (7.5%CO_2), puis congelé à - 20°C pendant 16h minimum. La stimulation de l'hybridome est mesurée par la teneur en IL2 du surnageant dans un test de prolifération de cellules CTL-L. Les écarts types ne sont pas mentionnés, car l'erreur est inférieure à 10% de la moyenne des triplicats.

1.7 Dosage de l'IL2 et de l'IL4

La lignée CTL-L est dépendante de l'Interleukine 2 et de l'Interleukine 4; elle est

maintenue en culture en milieu complet enrichi de 20% de surnageant de splénocytes de rat, incubés 36h avec 2,5 µg/ml de concanavaline A.

Après décongélation, les surnageants de cultures (testés au 1/2) sont incubés en présence de $2,25.10^4$ cellules CTL-L, préalablement lavées trois fois dans le milieu RPMI1640, pendant 3 jours à 37°C (7,5% CO_2).

La prolifération cellulaire est mesurée par addition de thymidine tritiée d'activité spécifique 1 Ci/mmole, à raison de 2 µCi/ml de culture, pendant les 16 dernières heures de culture.

L'ADN des cellules est récupéré après lyse des cellules et filtration à l'aide d'un "Skatron". L'incorporation de radioactivité est comptée par scintillation à l'aide d'un compteur-bêta.

Les résultats sont exprimés en cpm à partir de la moyenne des triplicats, corrigée de la radioactivité incorporée en l'absence d'antigène.

1.8 Test de prolifération

La rate et/ou les ganglions inguinaux sont prélevés stérilement 7 ou 14 jours après l'immunisation des souris (voir protocole d'immunisation). 8.10^5 cellules sont incubés en présence de différentes concentrations d'antigène, soluble ou couplé aux billes. Les cellules sont mises en culture (triplicats) dans du milieu RPMI 1640 (SEROMED) additionné de 1.5% de sérum de veau foetal décomplémenté, 0,5% de sérum normal de souris, 50 µM de β2-mercaptoéthanol, 2mM de glutamine, 100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine; en microplaques (Corning 25860) pendant 4 jours à 37°C (7,5% CO_2).

La prolifération des cellules est mesurée par incorporation de thymidine tritiée, d'activité

spécifique 25 Ci/mmole, à raison de 2 µCi/ml de culture, pendant les 16 dernières heures. L'ADN des cellules est récupéré après lyse des cellules et filtration à l'aide d'un Skatron, l'incorporation de radioactivité est comptée par scintillation à l'aide d'un compteur-bêta.

Les résultats sont exprimés en cpm à partir de la moyenne des triplicats, corrigée de l'incorporation en absence d'antigène.

2 - RESULTATS.

2.1. Stimulation par le lysozyme couplé aux microparticules de cellules ganglionnaires de souris immunisées par le lysozyme.

Dans les essais illustrés aux Figures 3A et 3B, des souris BALB/c ont été immunisées par injection sous-cutanée à la base de la queue avec du lysozyme soluble complémenté avec de l'adjuvant de Freund (CFA).

Après 14 jours, les ganglions inguinaux ont été prélevés, et la réponse proliférative de ces cellules a été testée in vitro contre différentes concentrations de lysozyme ou contre différentes concentrations de microparticules couplées au lysozyme. Les résultats sont exprimés en cpm corrigés de la valeur obtenue sans antigène.

Le lysozyme soluble induit une prolifération importante des cellules de souris immunisées par cet antigène en adjuvant de Freund (3A). La stimulation in vitro de ces mêmes cellules par les microparticules-lysozyme révèle que celles-ci sont capables d'induire une très forte prolifération cellulaire (figure 3B). Les microparticules de plus grand diamètre, 0,81 et 0,96 µm (couplage spontané), sont très efficaces.

2.2. Stimulation par le lysozyme couplé aux billes de l'hybridome T.

Les figures 4A et 4B correspondent aux résultats de stimulation de l'hybridome T, spécifique du lysozyme par le lysozyme soluble (4A) ou couplé aux microparticules (4B). Le degré de stimulation de l'hybridome a été mesuré par le taux d'IL-2/IL-4 produites.

En présence de splénocytes irradiés, l'hybridome T est stimulé fortement par le lysozyme soluble (figure 4A). En présence de ces cellules, les microparticules-lysozyme de grande taille (0,81 et 0,96 µm) entraînent également une production d'IL-2/IL-4 importante (figure 4B), contrairement aux microparticules de 0,5 et 0,25 µm qui ne sont pas capables de stimuler l'hybridome T spécifique.

2.3. Incapacité des cellules A20 de lymphome B à présenter le lysozyme couplé aux billes à l'hybridome T, spécifique du lysozyme.

On sait que des tumeurs cellulaires B portant des récepteurs Ia peuvent être utilisés comme cellules présentant des antigènes pour des antigènes qui n'ont pas de réactivité avec le récepteur Ig mais qui sont fixés par les tumeurs de cellules B par des mécanismes non spécifiques (Walker et al. J. Immunol. (1982) 128:2164; Glimcher et al. J. Exp. Med. (1982) 155:445; Mac Kean et al. J. Exp. Med. (1981) 154:1419; Mac Kean et al. J. Exp. Med. (1981) 154:1419).

On a donc testé la capacité d'une de ces tumeurs cellulaires B, la lignée A20, à présenter le lysozyme sous forme soluble ou particulaire.

La présentation du lysozyme soluble ou particulaire a été comparée en utilisant deux sources de CPA: soit une source hétérogène, les splénocytes totaux irradiés, soit des cellules B provenant du lymphome A20. Lorsque l'antigène est sous forme soluble (figure 5A), il peut stimuler l'hybridome T

aussi bien en présence de splénocytes que des cellules B A20. Au contraire, le lysozyme particulaire est présenté uniquement par les splénocytes et non par les cellules B A20 (figure 5 B).

Ces résultats confirment que les splénocytes peuvent présenter aux cellules T un antigène, qu'il soit soluble ou sous forme particulaire. Par contre, les lymphocytes B sont incapables de présenter un antigène rendu particulaire par couplage à des billes d'une taille de l'ordre du micron.

2.4 Induction de réponses T prolifératives par injection à des souris de lysozyme couplé aux microparticules.

L'immunogénicité in vivo de l'antigène couplé aux microparticules a été analysée en immunisant des souris BALB/c avec du lysozyme en adjuvant complet de Freund ou avec cet antigène couplé à des billes de polyacroléine. Après 14 jours, les cellules des ganglions drainants de ces animaux ont été stimulées in vitro par différentes concentrations de lysozyme soluble.

En présence de lysozyme soluble, les cellules ganglionnaires prolifèrent fortement, qu'elles proviennent de souris immunisées avec le lysozyme soluble ou avec des microparticules-lysozyme (figure 6A). Ceci démontre que dans les deux cas, des cellules T spécifiques du lysozyme ont été sensibilisées in vivo. Après injection à des souris de microparticules-LH représentant le contrôle de spécificité, les cellules ganglionnaires de ces animaux sont incapables de proliférer en réponse à une stimulation par le lysozyme soluble in vitro (figure 6B). La réponse cellulaire in vitro est donc spécifique de l'antigène protéique couplé aux microparticules, utilisé lors de l'immunisation des souris.

La réponse proliférative des cellules sensibilisées par 10^9 microparticules-lysozyme (correspondant à 1 µg de lysozyme) en absence d'adjuvant, est aussi élevée que celle des cellules d'animaux immunisés par 100 µg de lysozyme soluble en adjuvant de Freund (CFA) (figure 6A). Pour vérifier et préciser ce résultat, les réponses prolifératives des cellules ganglionnaires d'animaux ayant reçu différentes doses de lysozyme en CFA ou différentes concentrations de microparticules couplées ont été comparées, après stimulation in vitro par le lysozyme soluble.

Dans le cas des Figures 7A et 7B, des souris ont été immunisées par injection sous-cutanée à la base de la queue avec du lysozyme soluble et de l'adjuvant complet de Freund (CFA) (Figure 7A) ou des billes couplées à l'antigène sans aucun adjuvant (Figure 7B).

Après 14 jours, les ganglions inguinaux ont été prélevés, et la réponse proliférative de ces cellules a été testées in vitro contre différentes concentrations de lysozyme. Les résultats sont exprimés en cpm corrigés de la valeur obtenue sans antigène.

Sur la Figure 7B, il est à noter que les dénominations 10^9, 10^8, 10^7 et 10^6 B-LYSO correspondant respectivement à des poids de 1; 0,1; 0,01 et 0,001 µg en lysozyme.

Ces résultats démontrent que les cellules ganglionnaires des animaux immunisés avec des microparticules portant du lysozyme prolifèrent in vitro après mise en contact avec le lysozyme, indiquant ainsi une sensibilisation des cellules T spécifiques de cet antigène.

La comparaison des effets doses (Figure 7)

indique que 1 µg de lysozyme couplé aux billes donne une réponse quasi-équivalente à celle de 1 µg d'antigène injecté en CFA.

La figure 8 représente la réponse proliférative des cellules de souris immunisées par le lysozyme en adjuvant complet de Freund (CFA) ou en PBS avec des microparticules couplées au LH. L'addition de billes LH au lysozyme ne permet pas d'induire des réponses prolifératives élevées ce qui indique que le lysozyme doit être couplé de façon covalente aux microparticules pour induire des réponses T prolifératives.

2.5 - Induction de réponses T-prolifératives par injection d'hémoglobine ou d'ovalbumine couplée à des microparticules à des souris

Des souris ont été immunisées par l'hémoglobine ou l'ovalbumine en adjuvant complet de Freund, ou avec ces protéines couplées par liaison covalente au même type de particules que dans les exemples précédents (polystyrène, diamètre de 1 µm).

Les cellules des ganglions de ces animaux ont été restimulées in vitro par les protéines solubles et la prolifération cellulaire a été mesurée.

Les résultats obtenus pour l'hémoglobine (Hb) sont représentés sur la Figure 9, tandis que la Figure 10 illustre les résultats obtenus avec l'ovalbumine (OVA).

L'ensemble de ces résultats montre que ces protéines couplées à des microparticules sont capables de sensibiliser in vivo des lymphocytes T, $CD4^+$ spécifiques de ces protéines, en l'absence d'adjuvant.

2.6 - Induction de réponses T-prolifératives par injection de peptides synthétiques

2.6.1 - Epitope T de la région C3 de la protéine VP1

L'épitope T de la région C3 (C3: T, 103-115) de la protéine du polyovirus a été synthétisé et couplé de façon covalente à des billes de 1 µm. Ces billes ont été injectées à des souris BALB/C.

Les résultats de la Figure 11 établissent de manière claire que l'épitope T couplé aux billes (B-C3:T) induit une forte réponse T-prolifération pour des quantités de l'ordre de 10^9 billes injectées par souris.

2.6.2 - Peptide pré-S:T de l'antigène HBS

Le peptide pré-S:T (120-132) de l'antigène HBS a été synthétisé et couplé de manière covalente par le glutaraldéhyde à des billes ayant un diamètre de 1 µm.

La Figure 12 montre que l'injection de 10^9 billes à des souris DBA/1 induit une forte réponse T-proliférative supérieure à celle obtenue avec le peptide en CFA. L'injection de billes ne contenant que l'épitope B n'induit pas de réponse proliférative, ce qui démontre la spécificité de la réponse.

EXEMPLE 3.

Induction de réponse anticorps par des microparticules portant un antigène.

Les matériels et méthodes sont similaires à ceux de l'Exemple 2.

1. Lysozyme et hémocyanine de Limulus

Pour les Figures 13A et 13B, des souris BALB/c ont été immunisées par injection intra-péritonéale avec 100 µg de lysozyme soluble en adjuvant (alum) ou avec les billes couplées à l'antigène: lysozyme ou Hémocyanine de Limulus (LH), sans aucun adjuvant.

Les injections ont été faites à JO, J21, J42, les sérums ont été prélevés à J20, J31, J40 et J52 ; et testés en ELISA pour leur teneur en anticorps. Les résultats sont exprimés en log10 du titre en anticorps anti-lysozyme (Figure 13A) et anti-KLH (Figure 13B).

Trois injections d'antigène ont été faites i.p. aux jours 0, 21 et 42. Les microparticules-lysozyme donnent de très bonnes réponses anticorps alors qu'aucune réponse anticorps n'est induite par les microparticules LH. Ces microparticules, par ailleurs, stimulent de façon très efficace les réponses T.

Une des différences entre le LH et le lysozyme réside dans leurs poids moléculaire (14500 pour lysozyme et 71000 pour LH).

A concentrations d'antigène couplé égales, la densité des molécules de LH sur les billes est donc environ 5 fois plus faible. Ceci pourrait expliquer l'absence de stimulation des réponses anticorps si celles-ci sont dues à la stimulation directe T-indépendante par l'antigène présent à forte densité sur les microparticules.

2. Hémoglobine et ovalbumine

Des souris ont été immunisées avec l'antigène soluble en adjuvant alum ou avec le même antigène sous forme particulaire, en l'absence d'adjuvant. L'apparition des anticorps a été alors suivie sur plusieurs semaines.

Dans le cas de l'hémoglobine (Hb), les souris ont été immunisées avec 100 µg de protéine ou 10^9 billes couplées à différentes densités avec la protéine (2.10^4 et 2.10^5 molécule/μm^2). Les billes portant l'ovalbumine (OVA) ont été testées à deux densités 7.10^3 et 7.10^4 molécule/μm^2).

Une première injection a été réalisée, puis deux autres injections ont été faites au vingt et unième jour et quarante deuxième jour. Les sérums ont été prélevés au vingtième jour, au trente et unième jour, au quarante et unième jour et au cinquante deuxième jour, puis ont été testés en ELISA pour leurs

teneurs en anticorps IgG. Les résultats sont exprimés en Log du titre en anticorps.

Les résultats de la Figure 14 montrent que l'hémoglobine couplé aux billes n'induit pas de réponse anticorps. Pour l'ovalbumine (Figure 15) des anticorps sont détectables après plusieurs injection si l'antigène est couplé à forte densité, mais ces réponses restent faibles. Ces résultats indiquent que des protéines de poids moléculaire élevé comme l'hémoglobine sont incapables d'induire des réponses anticorps, même si ces protéines sont couplées à une densité élevée sur des billes.

Ces résultats similaires à ceux obtenus avec le lysozyme et l'hémocyanine limulus confirment que des billes portant des protéines de haut poids moléculaire induisent des réponses T-prolifératives en l'absence de toute production d'anticorps.

De même, les protéines de poids moléculaire faible ou moyen, (inférieur à 50.000) peuvent induire l'apparition d'anticorps si elles sont couplées à de fortes densités aux billes.

3. Peptides synthétiques

Les peptides pré-S:TB (120-145) et pré-S:B correspondant à des parties de l'antigène HBS contenant respectivement un épitope T et un épitope B ou seulement l'épitope B ont été couplés de façon covalente à des billes de 1 µm par le glutaraldéhyde (B-pré-S:TB et B-pré-S:B).

La réponse anticorps induite par ces billes a été comparée à celle induite par 10 µg de peptide pré-S:TB soluble en adjuvant alum.

Les résultats de la Figure 16 montrent que les billes couplées au peptide TB, comprenant un épitope T et un épitope B induisent de fortes réponses anticorps, ce qui confirme que des antigènes de

faibles poids moléculaires couplés à des billes permettent l'induction de réponse anticorps en l'absence de tout adjuvant. On notera que ces réponses sont aussi bonnes que celles obtenues avec le peptide libre en présence d'adjuvant alum.

EXEMPLE 4

Effet de la densité en lysozyme à la surface de microparticules sur leur immunogénéicité

Les matériels et méthodes utilisés sont similaires à ceux de l'Exemple 2.

L'immunogénicité des billes couplées avec du lysozyme et présentant un nombre de molécules variables à leur surface a été testée dans les expériences présentées Figures 17 et 18.

Pour la Figure 17A, des souris BALB/c ont été immunisées par injection sous-cutanée avec 100 µg de lysozyme en CFA. Après 14 jours les ganglions inguinaux ont été prélevés et les cellules testées in vitro contre les billes portant différentes densités de lysozyme (de 1100 à 950.000 molécules de lysozyme ramenées à des billes de 1 µm de diamètre). Les résultats sont exprimés en cpm corrigés de la valeur obtenue sans antigène.

Pour la Figure 17B, des souris BALB/c ont été immunisées par injection sous-cutanée à la base de la queue avec du lysozyme soluble avec adjuvant (CFA) ou 10^9 billes portant différentes densités de lysozyme sans aucun adjuvant.

Après 14 jours, les ganglions inguinaux ont été prélevés, et la réponse proliférative de ces cellules a été testée in vitro contre différentes concentrations de lysozyme ou billes. Les résultats sont exprimés en cpm corrigés de la valeur obtenue sans antigène.

La prolifération des cellules ganglionnaires

provenant d'animaux immunisés par le lysozyme soluble en CFA a été testée après stimulation in vitro par les différentes microparticules-lysozyme. La réponse proliférative de ces cellules étant d'autant plus forte que la densité du lysozyme en surface des microparticules est élevée. Aucune prolifération des cellules ganglionnaires n'est obtenue après stimulation par les microparticules présentant une densité de 1.100 molécules de lysozyme par microparticule (figure 17A).

Dans l'expérience de la figure 17B, l'immunogénicité de ces microparticules a été testée in vivo. Des souris BALB/c ont été immunisées par les différentes microparticules, sans adjuvant, et les cellules ganglionnaires de ces animaux ont été stimulées in vitro par différentes concentrations de lysozyme soluble.

La prolifération des cellules ganglionnaires provenant d'animaux immunisés par les microparticules couplées au lysozyme à forte densité (950.000 et 210.000) est élevée, et comparable à la réponse des cellules sensibilisées par 100 µg de lysozyme en CFA. Après immunisation par les microparticules portant une densité moyenne de lysozyme (45.000), les cellules prolifèrent en réponse au lysozyme in vitro à partir de 10^{-1} µg/ml. Les microparticules de plus faible densité n'ont pas sensibilisé les cellules T in vivo, car aucune prolifération n'a été observée en présence de lysozyme même à concentration élevée (figure 17B).

Il est à noter que 10^9 microparticules couplées avec le lysozyme à haute densité correspondent à 23µg (1-950.000-G) et 5 µg (1-210.000-G) de lysozyme couplé, cependant la prolifération des cellules est aussi élevée qu'après injection de 100 µg de lysozyme en CFA.

Pour la Figure 18, des souris BALB/c ont été immunisées par injection sous-cutanée de lysozyme avec adjuvant (CFA) ou avec 10^9 microparticules portant différentes densités de lysozyme (950.000; 210.000, 45.000 et 1100 molécules respectivement, ramenées à une microparticule de 1 μm de diamètre).

Après 14 jours, les sérums ont été prélevés et testés en ELISA pour leur teneur en anticorps anti-lysozyme. Les résultats sont exprimés en log10 du titre en anticorps.

La réponse humorale des souris immunisées par ces microparticules présentant différentes densités de lysozyme a été étudiée. L'injection de 100 μg de lysozyme en CFA induit un taux élevé d'anticorps anti-lysozyme (figure 18). Quatorze jours après l'immunisation, les billes couplées à la plus forte densité de lysozyme (950.000) ont induit une production d'anticorps significative, alors que les billes de densité inférieure n'ont pas stimulé l'induction de réponse anticorps anti-lysozyme significative. Il faut noter, en particulier, que les billes de densité 210.000 qui ont induit une excellente prolifération spécifique du lysozyme n'ont pas stimulé la production d'anticorps.

Ces résultats révèlent que la prolifération de cellules T est induite avec des densités de lysozyme allant de 45.000 à 950.000 molécules de lysozyme par microparticule, alors que la production d'anticorps nécessite une densité importante de protéine couplée aux microparticules.

Au sens de la présente description, l'expression "microparticules " désigne des particules pouvant avoir diverses configurations géométriques et spatiales. Dans la pratique, il s'agit préférentiellement de microsphères ou billes, telles

qu'elles sont obtenues par les techniques usuelles de fabrication des polymères.

REVENDICATIONS

1. Utilisation de microparticules en matériau synthétique polymère, portant en surface une ou plusieurs protéines liées de manière covalente, la ou lesdites protéines portant chacune un ou plusieurs épitopes, pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin pour l'induction d'une réponse immunitaire, les densités de la ou des protéines à la surface des microparticules étant ajustées afin d'orienter ladite réponse immunitaire, vers l'induction d'une réponse humorale et cellulaire ou vers l'induction d'une réponse majoritairement cellulaire.

2. Utilisation selon la revendication 1, pour l'induction de réponses cellulaire et/ou humorale, caractérisée en ce que les microparticules présentent une densité pour chacune des protéines portant un épitope d'au minimum 10^5 molécules/μm^2 et préférentiellement 5.10^5 protéines/μm^2.

3. Utilisation selon la revendication 1, pour l'induction d'une réponse majoritairement cellulaire, caractérisée en ce que les microparticules présentent une densité pour chacune des protéines portant un épitope, comprise environ entre 10^4 et 5.10^4 molécules/μm^2.

4. Utilisation selon la revendication 1 pour l'induction d'une réponse majoritairement cellulaire , caractérisée en ce que les microparticules portent en surface des protéines ayant des poids moléculaires supérieurs à 50 kD.

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que les microparticules ont un diamètre moyen compris entre environ 0,25 et environ 1,5 μm, et préférentiellement de 1μm.

6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la liaison est effectuée

par réaction des fonctions NH_2 et/ou CO des protéines et du matériau constituant la microparticule.

7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la liaison des protéines et du matériau constituant la microparticule est covalente et est effectuée avec ou sans agent pontant.

8. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'agent pontant est le glutaraldéhyde ou le carbodiimide.

9. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que ledit matériau est un polymère biocompatible.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit polymère est le polyacroléine ou le polystyrène ou des polymères d'acide lactique ou des copolymères d'acides lactique et glycolique.

11. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 10, pour la fabrication d'un médicament pour la thérapeutique humaine, caractérisée en ce que ledit polymère est biodégradable.

12. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que les microparticules portent en surface des molécules susceptibles d'activer le système immunitaire.

13. Procédé pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin dont la réponse immunitaire est soit majoritairement humorale soit majoritairement cellulaire, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'on fixe de manière covalente sur des microparticules en matériau synthétique polymère au moins une protéine portant un ou plusieurs épitopes ou des peptides contenant uniquement des épitopes T ou B ou une composition des deux en faisant varier la densité de la protéine fixée à la surface selon le

type de réponse désirée.

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'on utilise des microparticules comme indiqué à l'une quelconque des revendications 1 à 12.

15. Microparticule en un matériau synthétique polymère portant en surface une ou plusieurs protéines liées de manière covalente au matériau constituant la microparticule, la ou lesdites protéines portant chacune un ou plusieurs épitopes, et étant présentes à des densités comprises entre 10^4 et $5.10.^5$ protéines/μm^2 pour chacune des protéines.

16. Microparticule selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle a un diamètre moyen compris entre environ 0,25 μm et 1,5 μm, et préférentiellement de 1μm.

17. Microparticule selon l'une des revendications 15 et 16, caractérisée en ce que la liaison est effectuée par réaction des fonctions NH_2 et/ou CO des protéines et du matériau constituant la microparticule.

18. Microparticule selon l'une des revendications 15 et 16, caractérisée en ce que la liaison des protéines et du matériau constituant la microparticule est effectuée par l'intermédiaire d'un agent pontant.

19. Microparticule selon la revendication 18, caractérisée en ce que l'agent pontant est le glutaraldéhyde, ou le carbodiimide.

20. Microparticule selon l'une des revendications 13 à 19, caractérisée en ce qu'elle est composée d'un polymère biocompatible.

21. Microparticule selon la revendication 20, caractérisée en ce que ledit polymère est la poly(acroléine) ou le polystyrène, un polymère d'acide

lactique ou un copolymère d'acide lactique et glycolique.

22. Microparticule selon la revendication 20, pour l'application en thérapeutique humaine, caractérisée en ce que ledit polymère est biodégradable.

23. Microparticule selon l'une des revendications 15 à 22, caractérisée en ce qu'elle porte en surface des molécules susceptibles d'activer le système immunitaire.

24. Microparticule selon l'une des revendications 15 à 23, caractérisée en ce que ladite protéine comprend l'épitope B de la région pré-s_2 de l'antigène HBs du virus de l'hépatite virale.

25. Microparticule selon l'une des revendications 15 à 23, caractérisée en ce que ladite protéine comprend l'épitope B de la protéine VP1 du virus de la poliomyélite.

26. Microparticule selon l'une des revendications 15 à 23, caractérisée en ce que ladite protéine comprend l'épitope B de la protéine gp 120 du virus HIV-1.

27. Médicament ou vaccin, caractérisé en ce qu'il comprend des microparticules selon l'une des revendications 15 à 26.

28. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend des microparticules selon l'une des revendications 15 à 26 en association avec des diluants et adjuvants pharmaceutiquement compatibles.

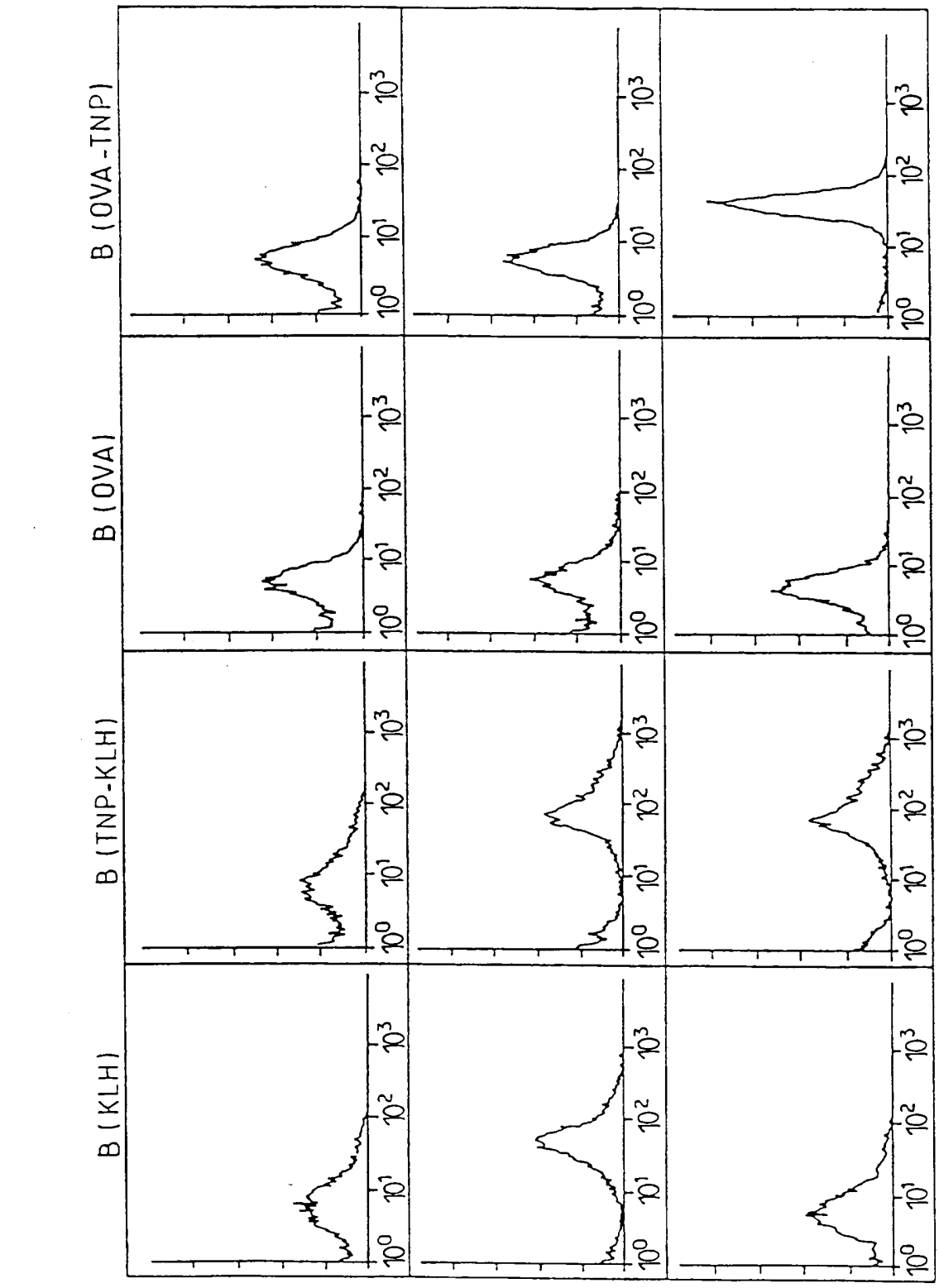

B (KLH)
B (TNP-KLH)
B (OVA)
B (OVA-TNP)
PBS
Anti-KLH
Anti-TNP
10^0
10^1
10^2
10^3

FIG. 1

FIG.2A

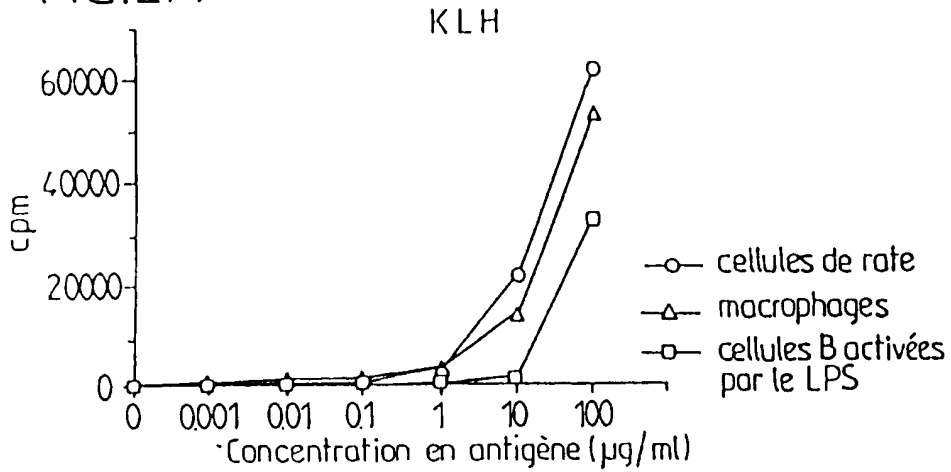


FIG.2B

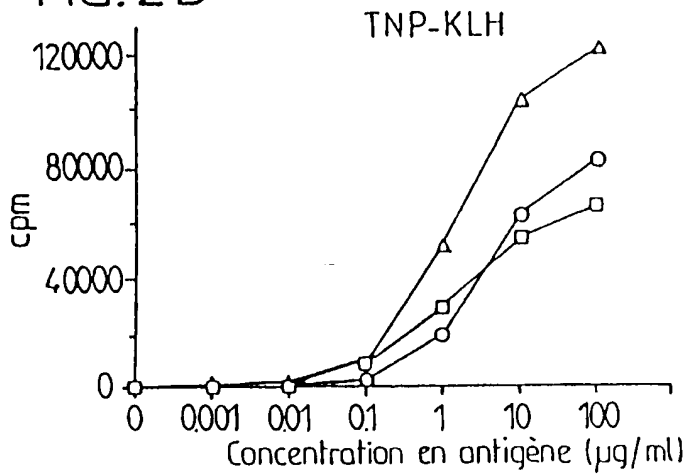


FIG.2C

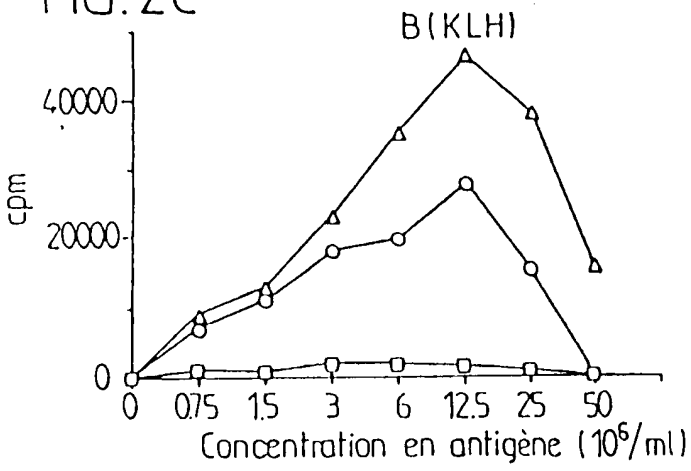


FIG.2D

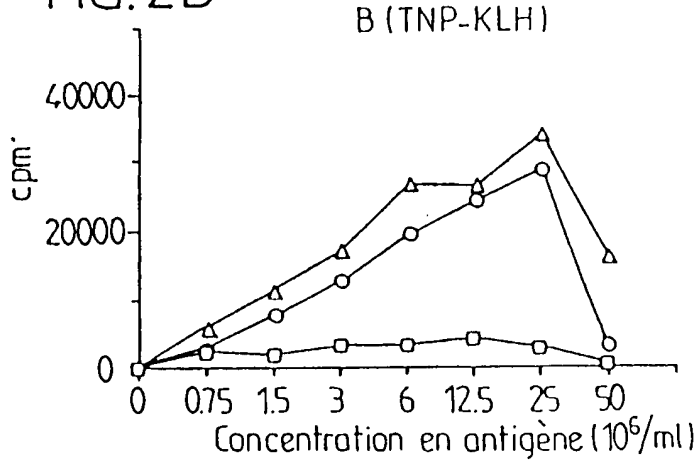


FIG. 3A

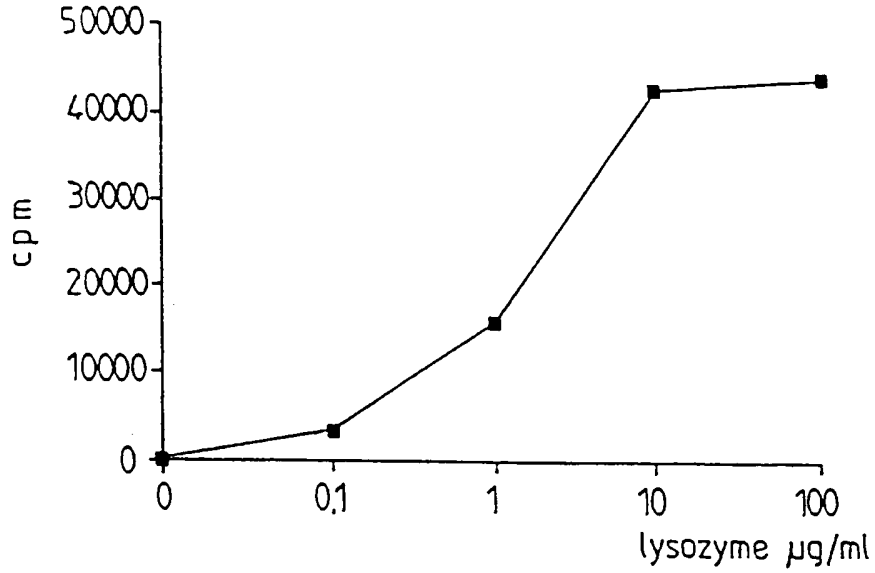

50000
40000
30000
20000
10000
0
cpm
0
0,1
1
10
100
lysozyme µg/ml

FIG. 3B

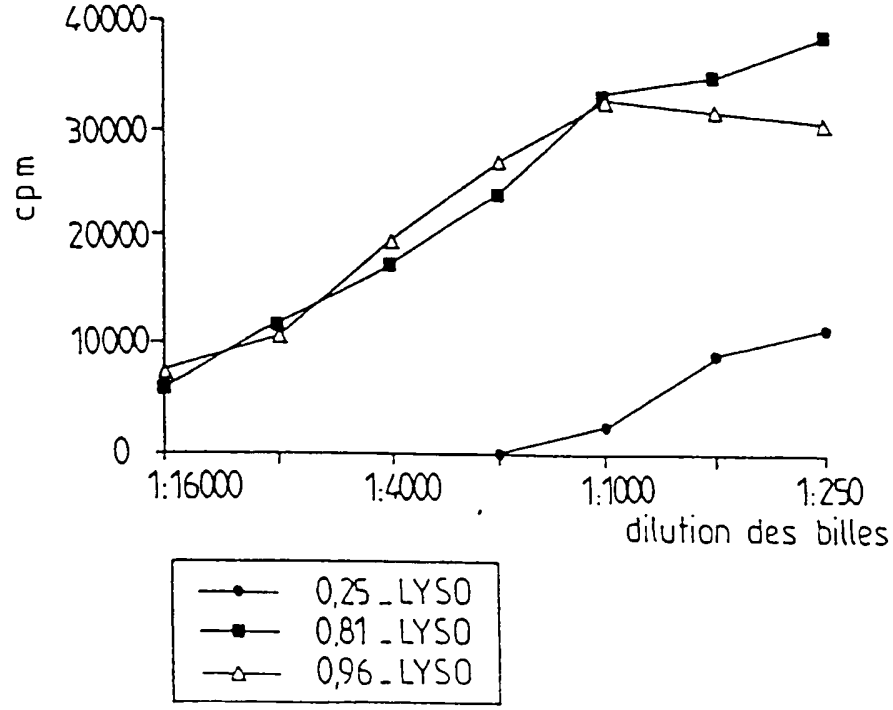

40000
30000
20000
10000
0
cpm
1:16000
1:4000
1:1000
1:250
dilution des billes
0,25 _ LYSO
0,81 _ LYSO
0,96 _ LYSO

FIG. 4A

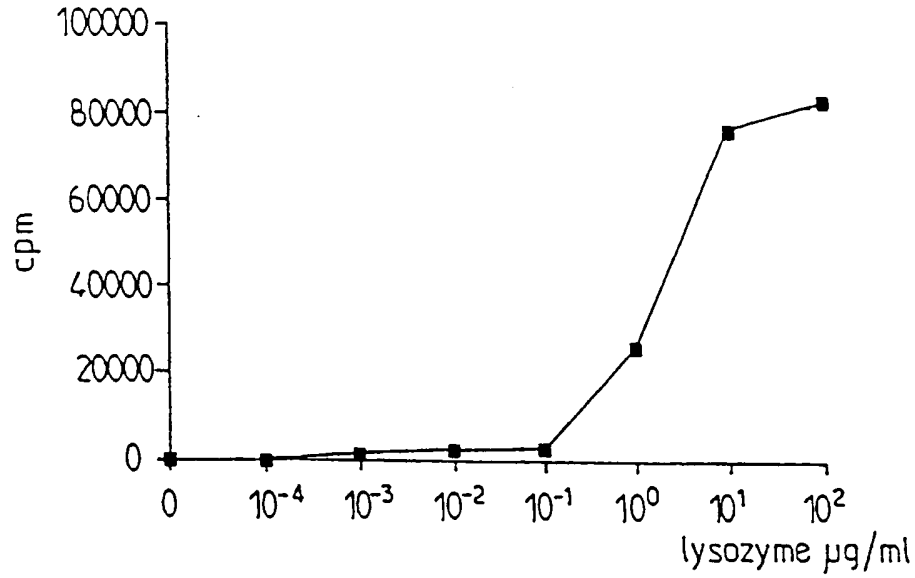

100000
80000
60000
40000
20000
0
cpm
0
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
lysozyme µg/ml

FIG.4B

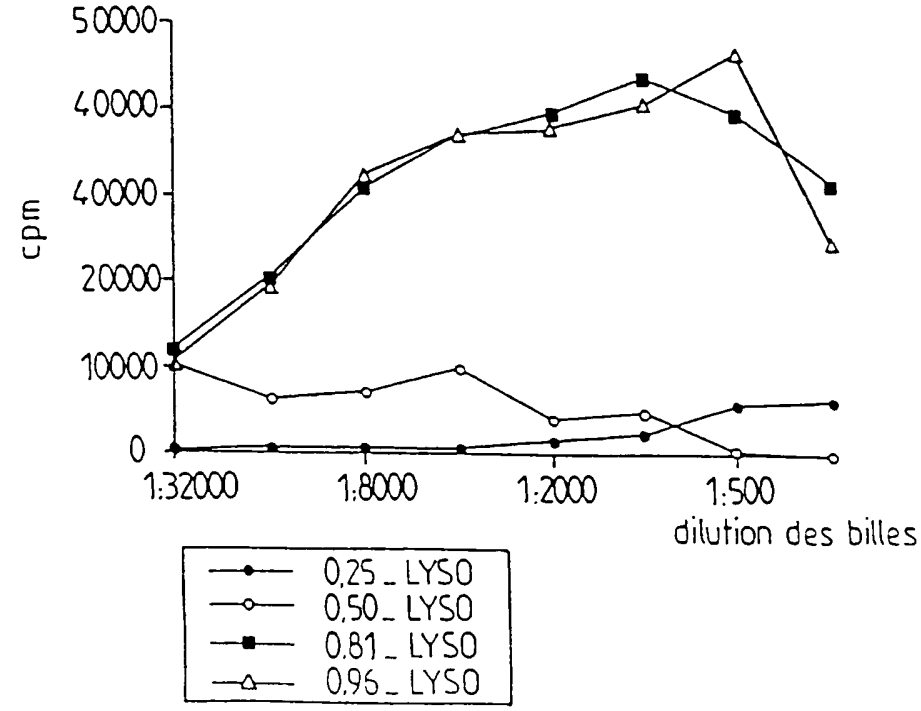

50000
40000
40000
20000
10000
0
cpm
1:32000
1:8000
1:2000
1:500
dilution des billes
0,25_LYSO
0,50_LYSO
0,81_LYSO
0,96_LYSO

FIG. 5A

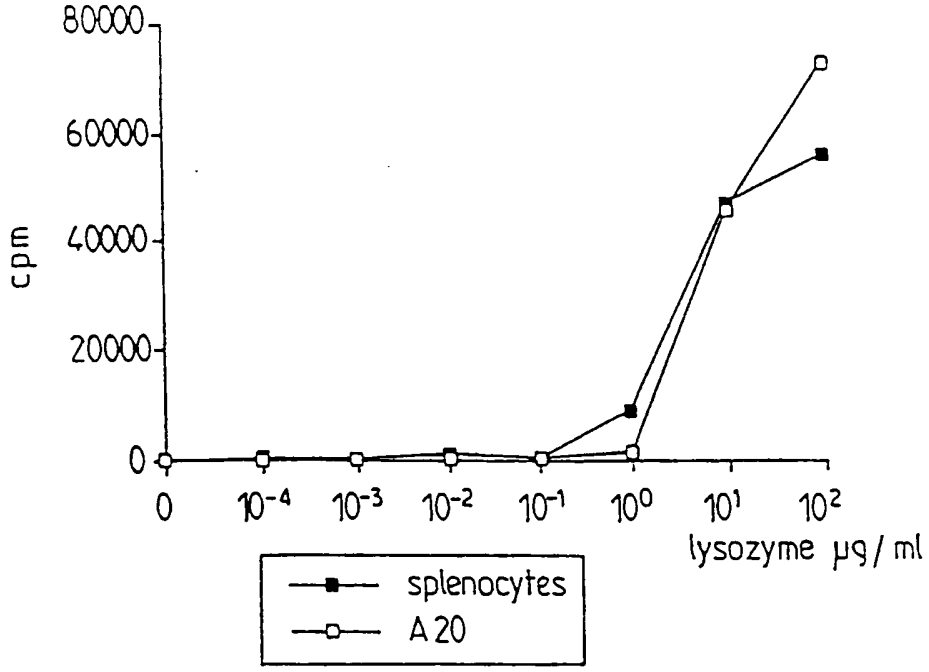

80000
60000
40000
20000
0
cpm
0
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
lysozyme µg/ml
splenocytes
A 20

FIG. 5B

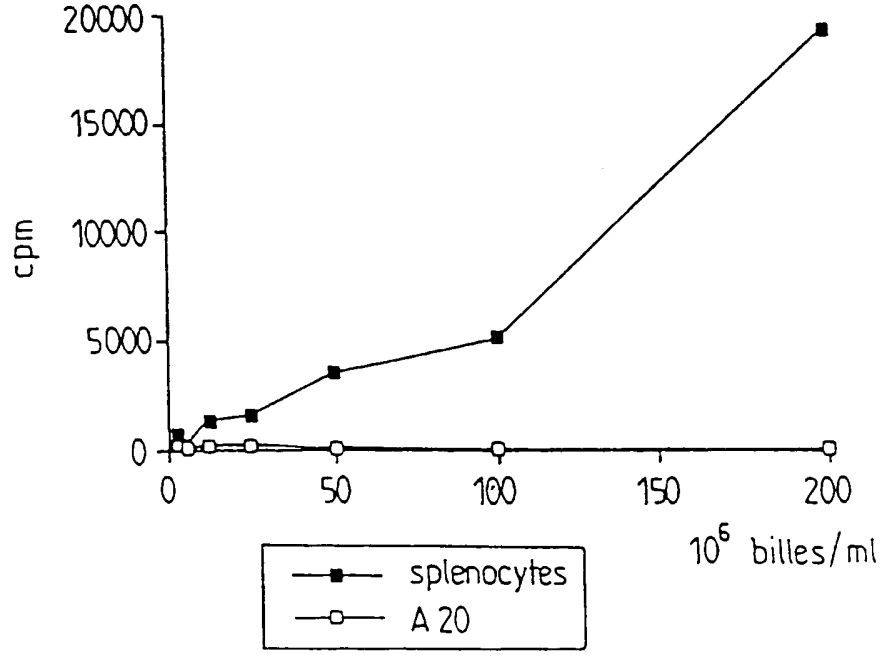

20000
15000
10000
5000
0
cpm
0
50
100
150
200
10^{6} billes/ml
splenocytes
A 20

FIG. 6A

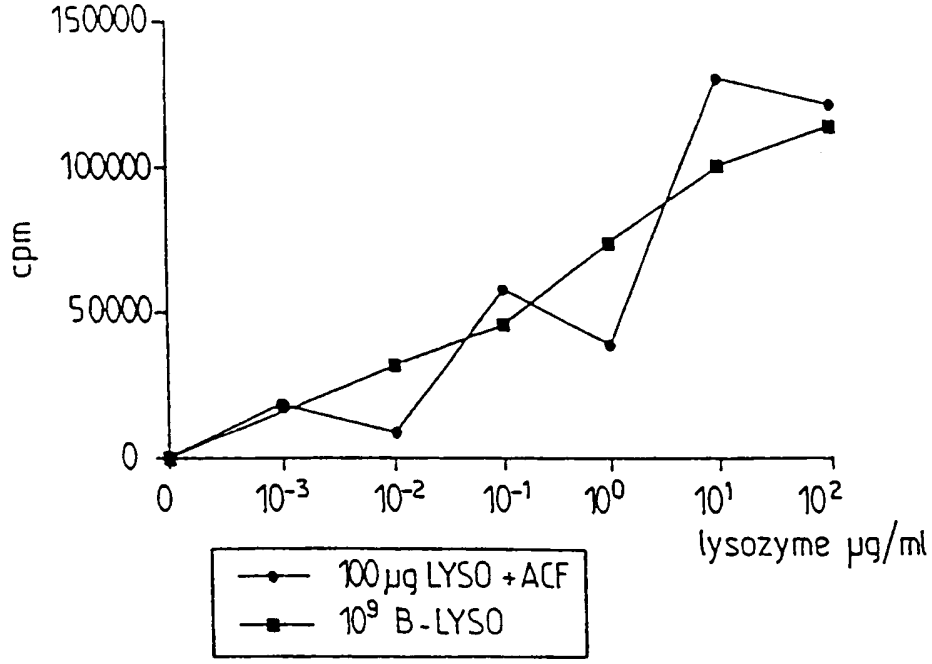

150000
100000
50000
0
cpm
0
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
lysozyme µg/ml
100 µg LYSO + ACF
10^{9} B-LYSO

FIG. 6B

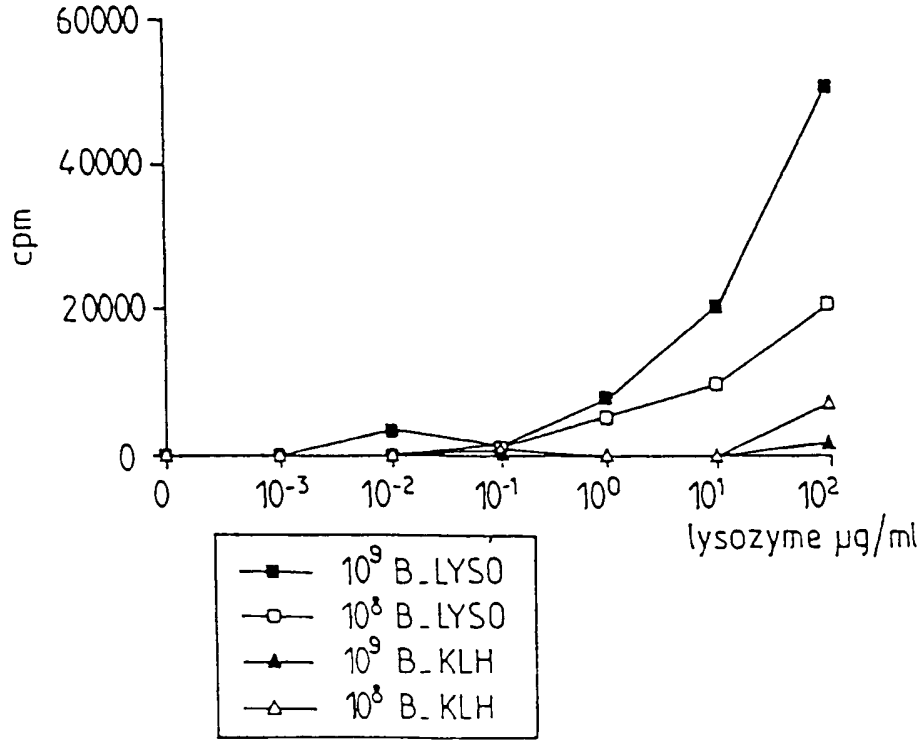

60000
40000
20000
0
cpm
0
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
lysozyme µg/ml
10^{9} B_LYSO
10^{8} B_LYSO
10^{9} B_KLH
10^{8} B_KLH

FIG. 7A

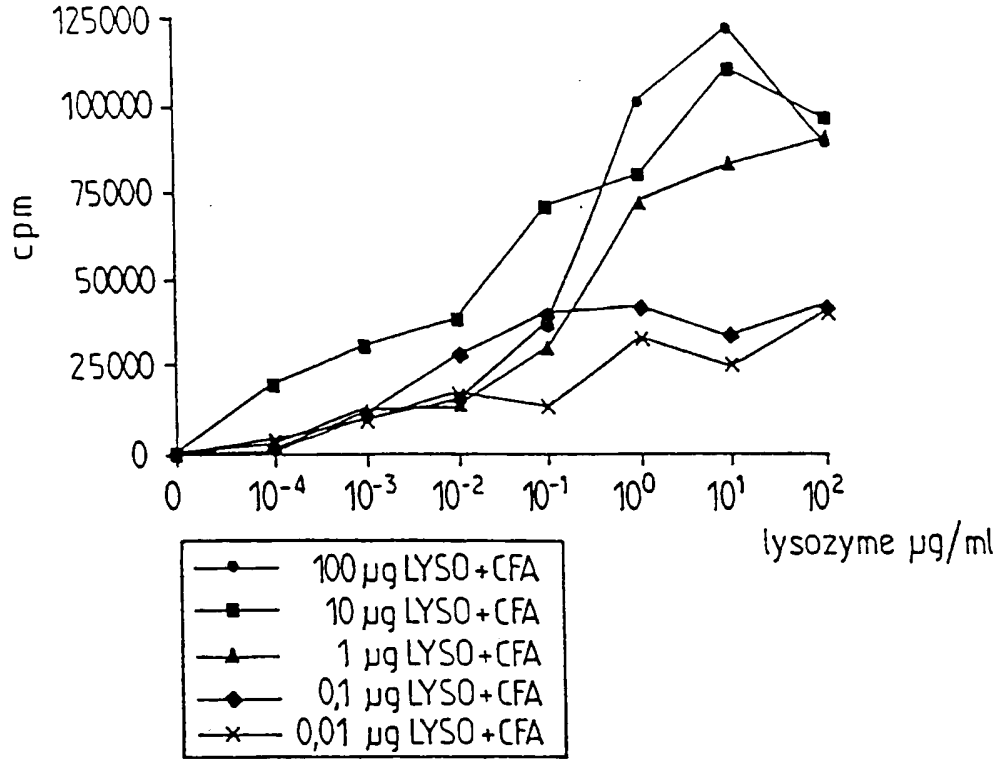
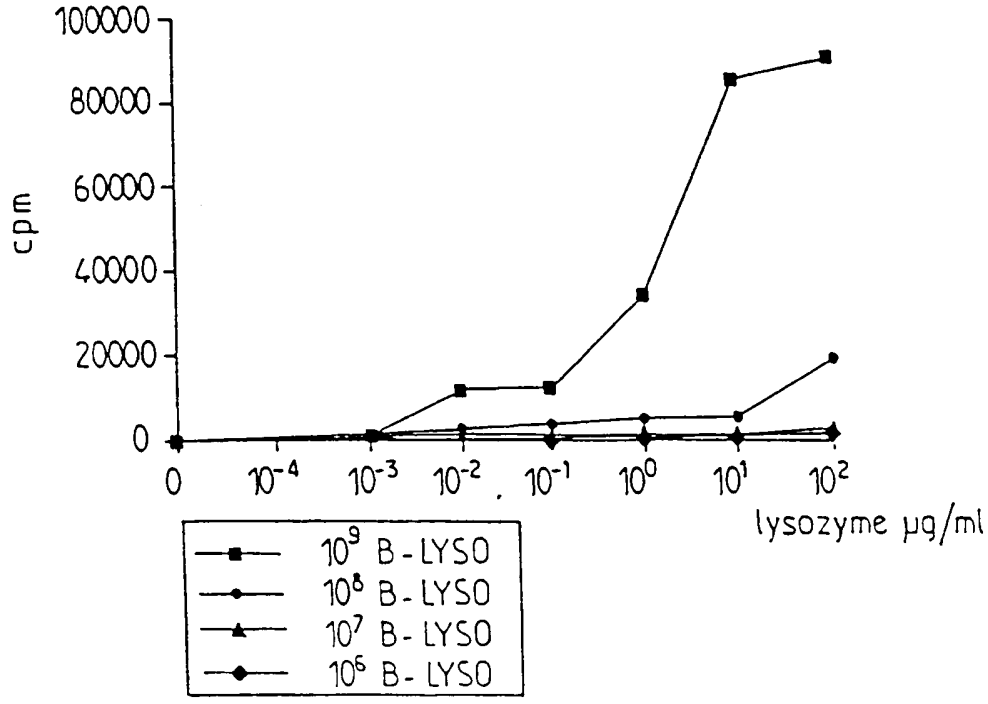

125000
100000
75000
50000
25000
0
cpm
0
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
lysozyme µg/ml
100 µg LYSO + CFA
10 µg LYSO + CFA
1 µg LYSO + CFA
0,1 µg LYSO + CFA
0,01 µg LYSO + CFA

FIG. 7B


100000
80000
60000
40000
20000
0
cpm
0
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
lysozyme µg/ml
10^{9} B-LYSO
10^{8} B-LYSO
10^{7} B-LYSO
10^{6} B-LYSO

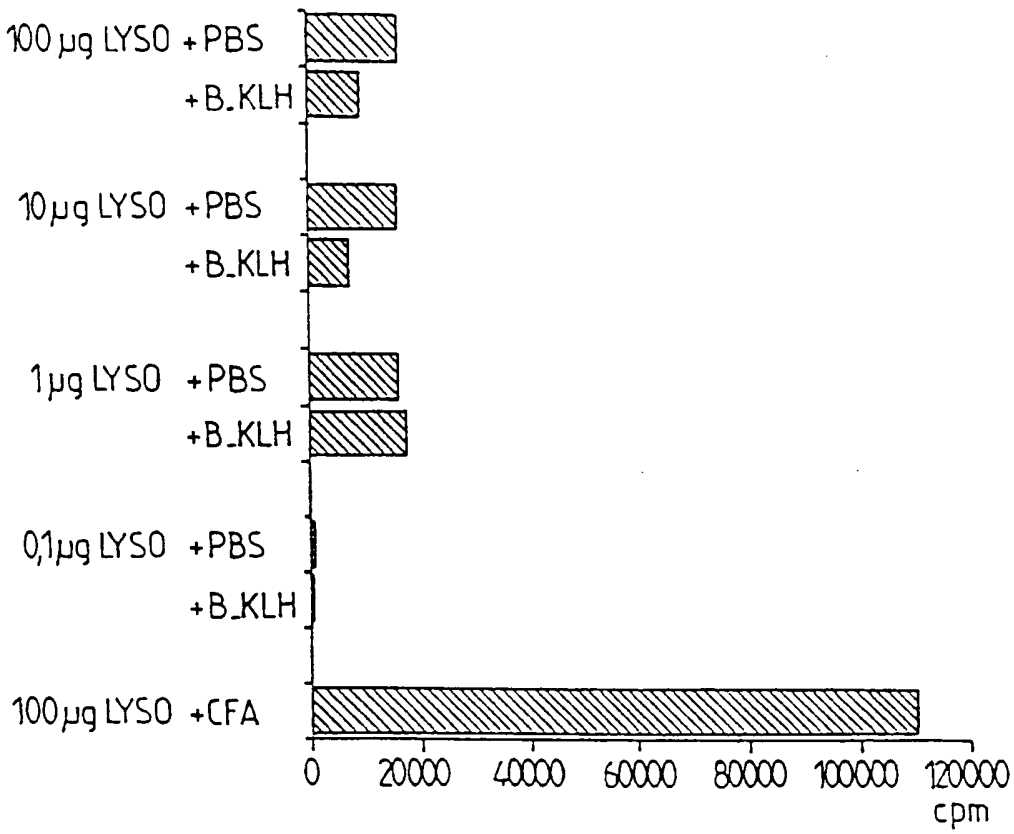

100 µg LYSO +PBS
+B_KLH
10 µg LYSO +PBS
+B_KLH
1 µg LYSO +PBS
+B_KLH
0,1 µg LYSO +PBS
+B_KLH
100 µg LYSO +CFA
0
20000
40000
60000
80000
100000
120000
cpm

FIG. 8

Fig 9

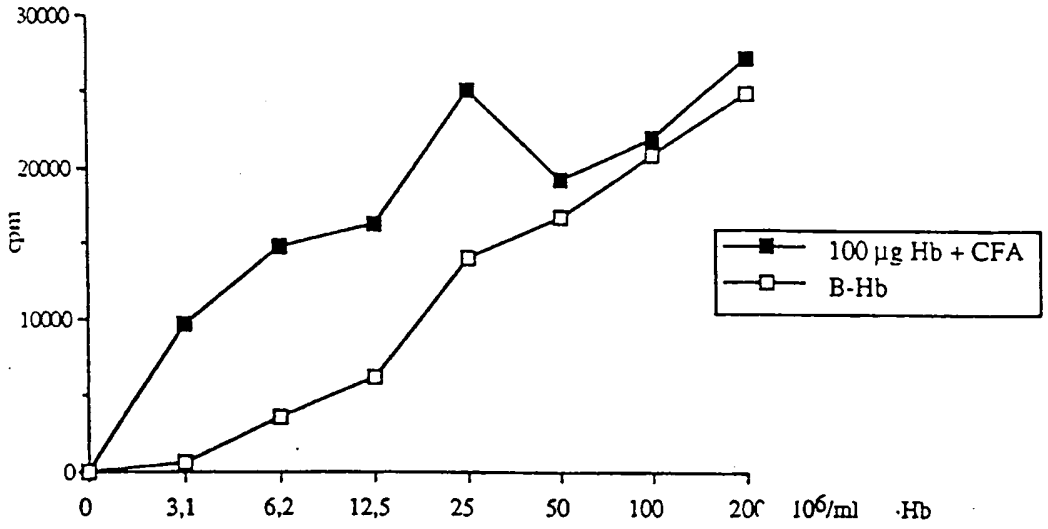

30000
20000
10000
0
cpm
100 µg Hb + CFA
B-Hb
0
3,1
6,2
12,5
25
50
100
200
10⁶/ml Hb

Fig 10

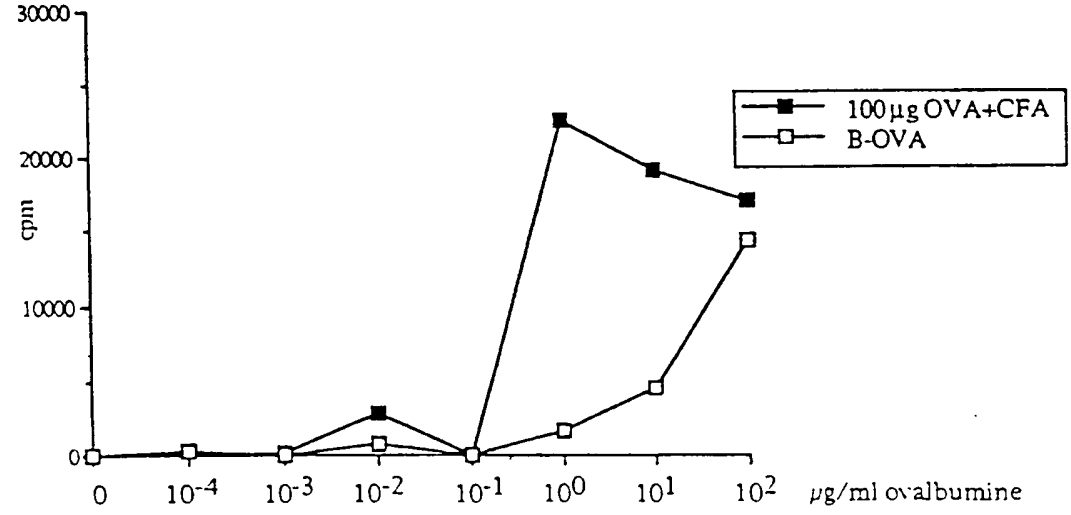

30000
20000
10000
0
cpm
100 µg OVA+CFA
B-OVA
0
10⁻⁴
10⁻³
10⁻²
10⁻¹
10⁰
10¹
10²
µg/ml ovalbumine

Fig 11

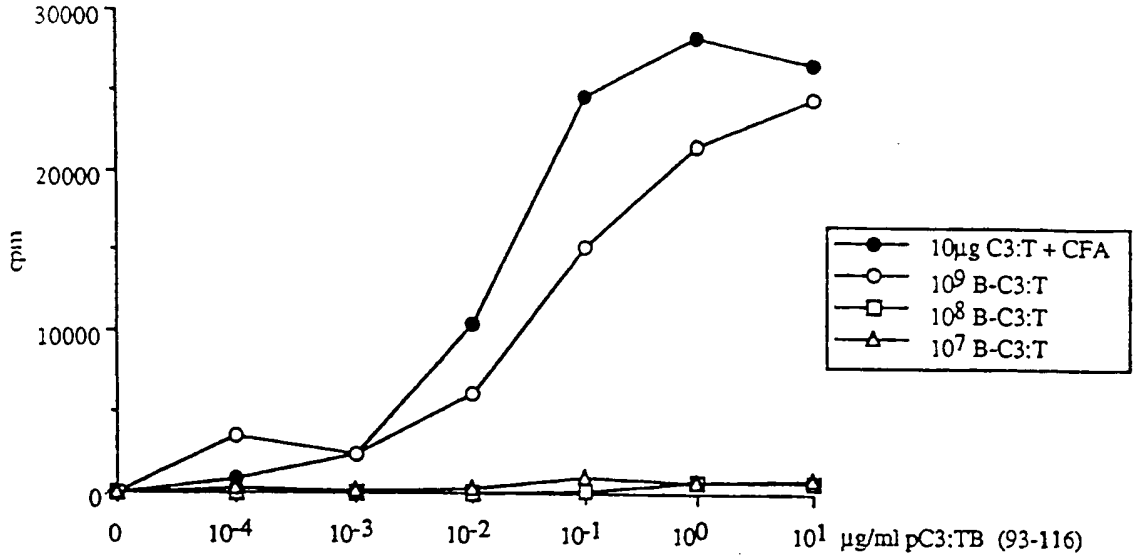

30000
20000
10000
0
cpm
0
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
µg/ml pC3:TB (93-116)
10µg C3:T + CFA
10^{9} B-C3:T
10^{8} B-C3:T
10^{7} B-C3:T

Fig 12

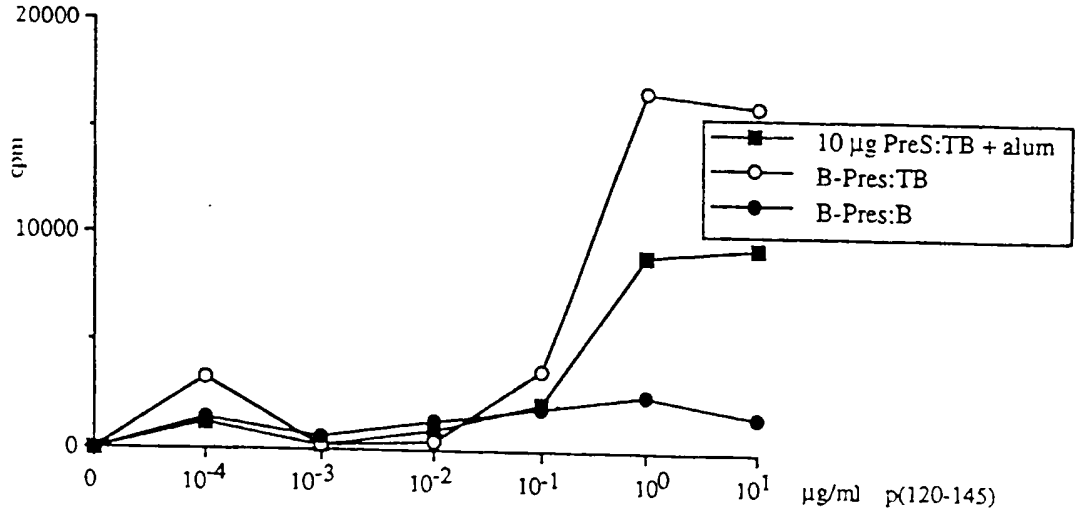

20000
10000
0
cpm
0
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
µg/ml p(120-145)
10 µg PreS:TB + alum
B-Pres:TB
B-Pres:B

Fig 13A

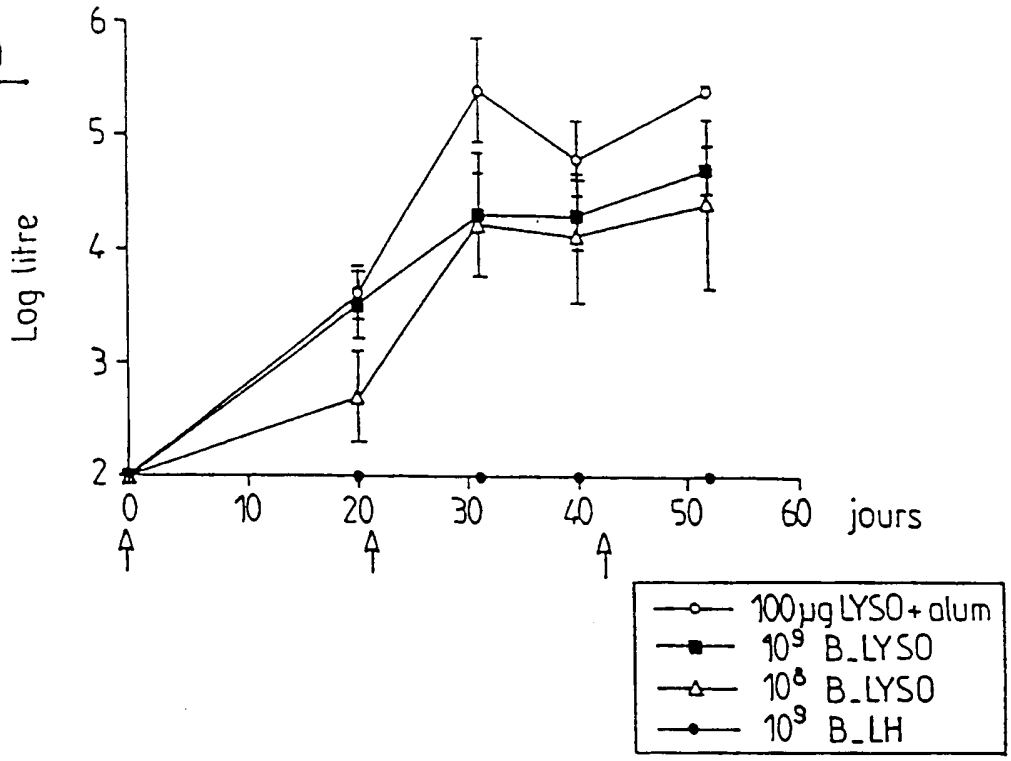


Fig 13B

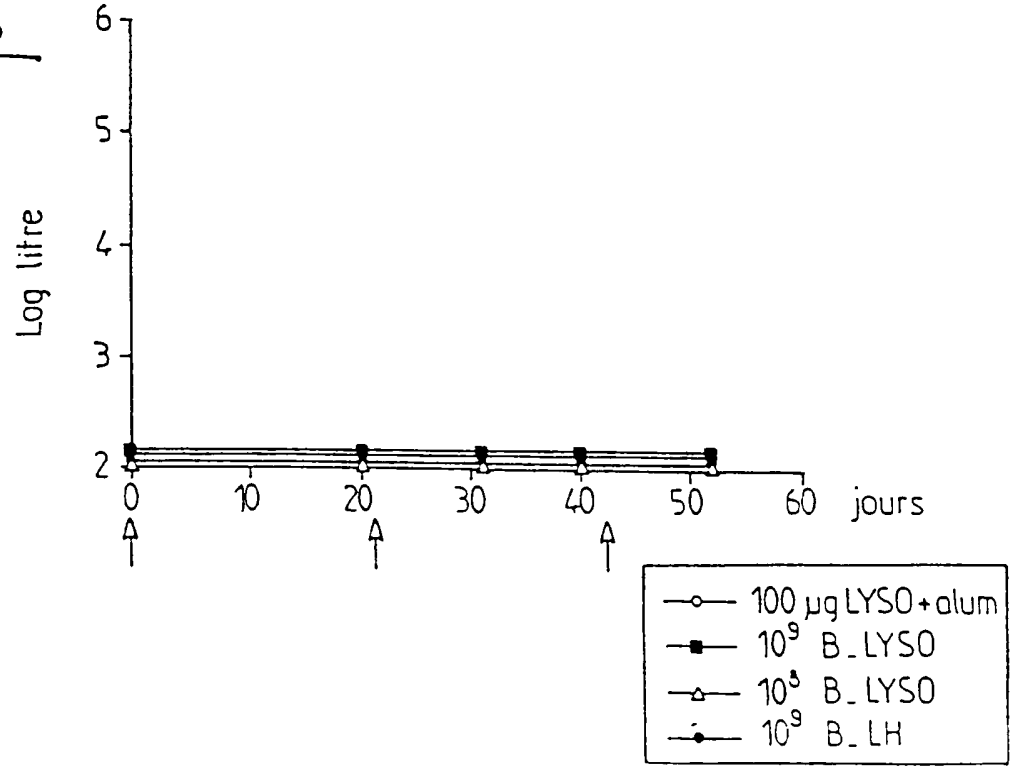


Fig 14

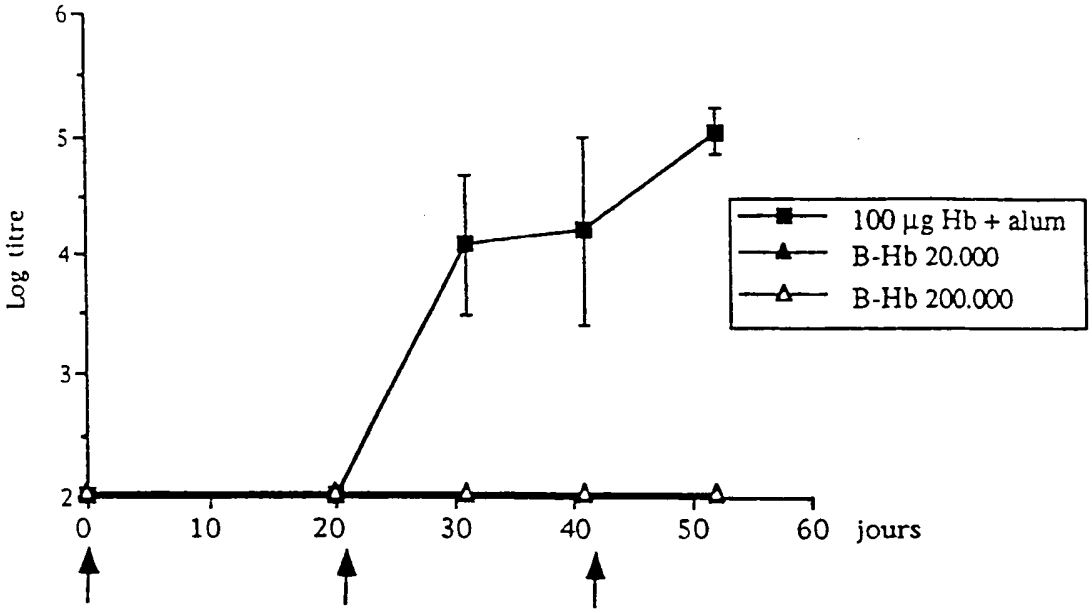

Log titre
6
5
4
3
2
0
10
20
30
40
50
60
jours
100 µg Hb + alum
B-Hb 20.000
B-Hb 200.000

Fig 15

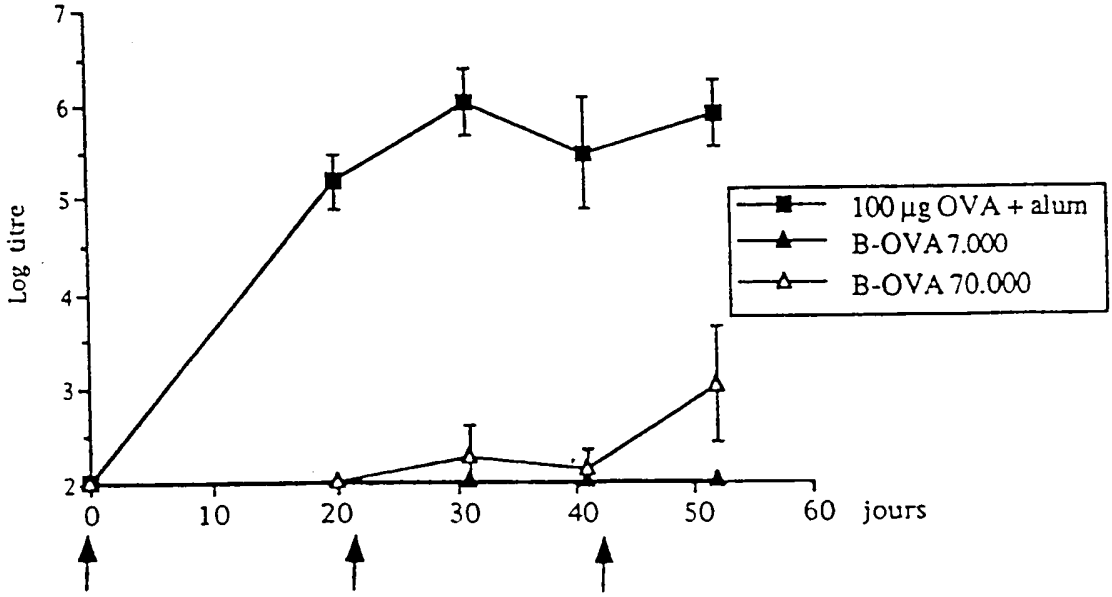

Log titre
7
6
5
4
3
2
0
10
20
30
40
50
60
jours
100 µg OVA + alum
B-OVA 7.000
B-OVA 70.000

Fig 17A

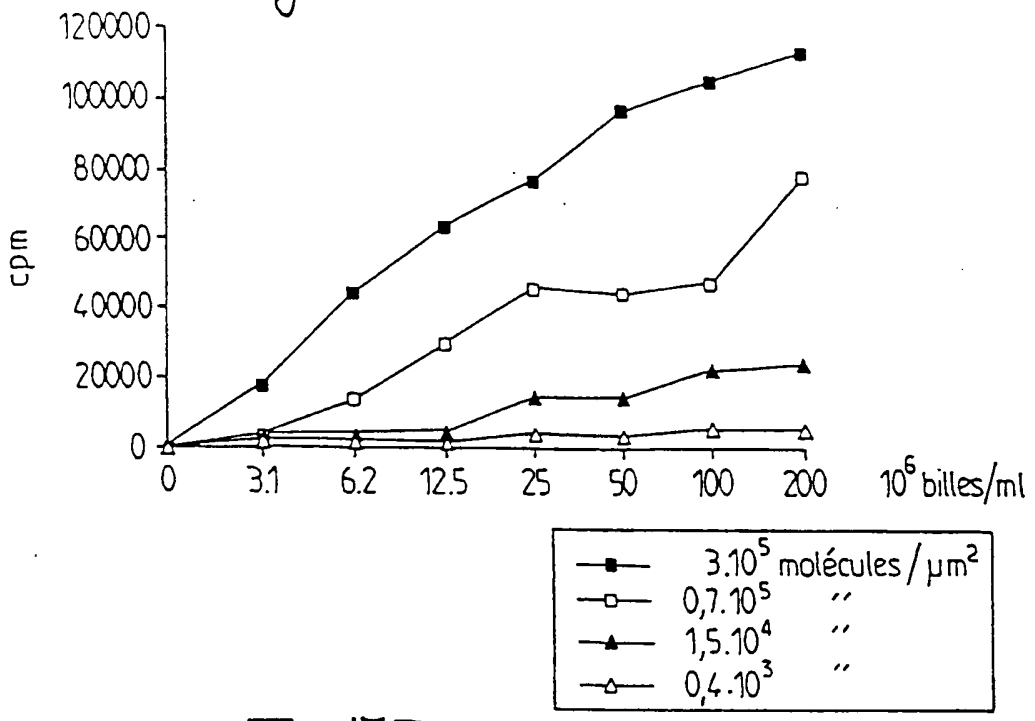


Fig 17B

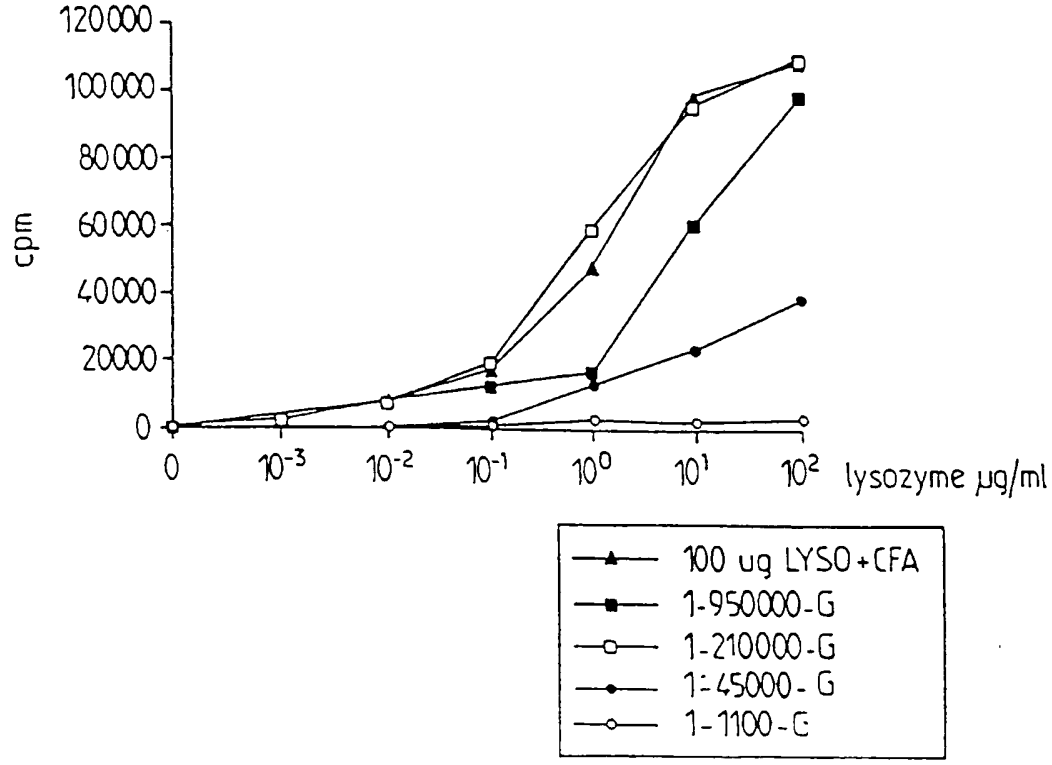


Fig 16

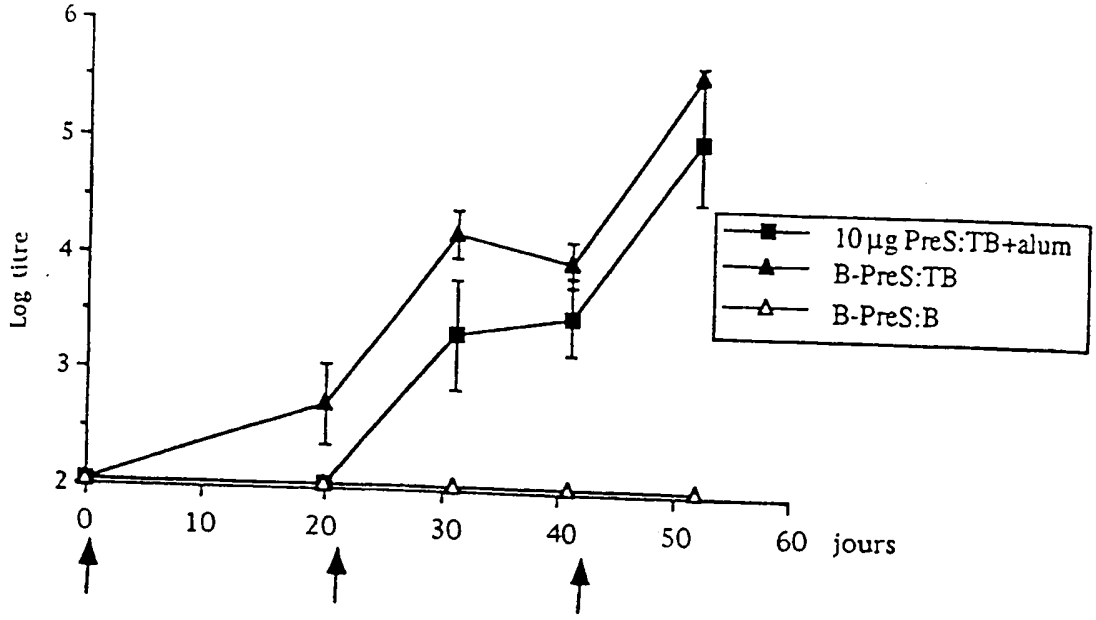
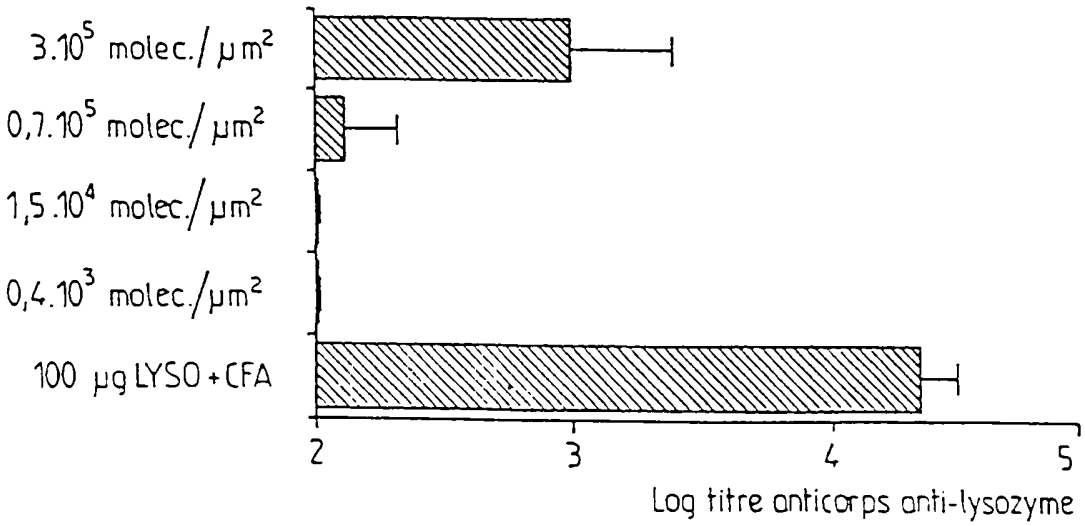

Log titre
6
5
4
3
2
0
10
20
30
40
50
60
jours
10 µg PreS:TB+alum
B-PreS:TB
B-PreS:B

Fig 18


3.10⁵ molec./µm²
0,7.10⁵ molec./µm²
1,5.10⁴ molec./µm²
0,4.10³ molec./µm²
100 µg LYSO + CFA
2
3
4
5
Log titre anticorps anti-lysozyme

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern al Application No
PCT/FR 93/00876

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 A61K39/385 A61K47/48 C07K17/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 5 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS vol. 52, no. 3 , 1982 pages 341 - 351 A. REMBAUM ET AL. 'CELL LABELING AND MAGNETIC SEPARATION BY MEANS OF IMMUNOREAGENTS BASED ON POLYACROLEIN MICROSPHERES' cited in the application see page 342, line 30 - page 343, line 31 --- -/--	15

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 November 1993	[illegible] 1993

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	REMPP, G

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY vol. 17 , September 1987 pages 1287 - 1296 H. KIRK ZIEGLER ET AL. 'DIFFERENTIAL REQUIREMENTS FOR THE PROCESSING AND PRESENTATION OF SOLUBLE AND PARTICULATE BACTERIAL ANTIGENS BY MACROPHAGES.' cited in the application the whole article	15-17, 20-23
A	EP,A,0 465 081 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 8 January 1992	
A	FR,A,2 304 326 (KREUTER JÖRG ET AL) 15 October 1976	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internati · Application No
PCT/FR 93/00876

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0465081	08-01-92	US-A-	5219577	15-06-93
		US-A-	5178882	12-01-93
		AU-B-	638841	08-07-93
		AU-A-	7921091	02-01-92
		CA-A-	2045204	23-12-91
FR-A-2304326	15-10-76	CH-A-	614856	28-12-79
		CH-A-	618352	31-07-80
		AU-B-	503982	27-09-79
		AU-A-	1220876	22-09-77
		BE-A-	839748	20-09-76
		DE-A,C	2611143	14-10-76
		GB-A-	1544107	11-04-79
		JP-C-	1451720	25-07-88
		JP-A-	51118823	19-10-76
		JP-B-	62059088	09-12-87
		NL-A-	7602717	22-09-76
		US-A-	4269821	26-05-81
		US-A-	4225581	30-09-80

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema internationale No
PCT/FR 93/00876

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 5 A61K39/385 A61K47/48 C07K17/08

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 5 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS vol. 52, no. 3 , 1982 pages 341 - 351 A. REMBAUM ET AL. 'CELL LABELING AND MAGNETIC SEPARATION BY MEANS OF IMMUNOREAGENTS BASED ON POLYACROLEIN MICROSPHERES' cité dans la demande voir page 342, ligne 30 - page 343, ligne 31 --- -/--	15

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
18 Novembre 1993	10 -12- 1993

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016	REMPP, G

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema internationale No
PCT/FR 93/00876

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY vol. 17 , Septembre 1987 pages 1287 - 1296 H. KIRK ZIEGLER ET AL. 'DIFFERENTIAL REQUIREMENTS FOR THE PROCESSING AND PRESENTATION OF SOLUBLE AND PARTICULATE BACTERIAL ANTIGENS BY MACROPHAGES.' cité dans la demande L'article en entier. ---	15-17, 20-23
A	EP,A,0 465 081 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 8 Janvier 1992 ---	
A	FR,A,2 304 326 (KREUTER JÖRG ET AL) 15 Octobre 1976 -----	

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR 93/00876

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP-A-0465081	08-01-92	US-A-	5219577	15-06-93
		US-A-	5178882	12-01-93
		AU-B-	638841	08-07-93
		AU-A-	7921091	02-01-92
		CA-A-	2045204	23-12-91
FR-A-2304326	15-10-76	CH-A-	614856	28-12-79
		CH-A-	618352	31-07-80
		AU-B-	503982	27-09-79
		AU-A-	1220876	22-09-77
		BE-A-	839748	20-09-76
		DE-A,C	2611143	14-10-76
		GB-A-	1544107	11-04-79
		JP-C-	1451720	25-07-88
		JP-A-	51118823	19-10-76
		JP-B-	62059088	09-12-87
		NL-A-	7602717	22-09-76
		US-A-	4269821	26-05-81
		US-A-	4225581	30-09-80